

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE (Ph.D)

PAR
JACOB A. SÉGUI
DIRECTEUR: PROFESSEUR MARIO J. FRAGATA (D.Sc.)

EFFETS DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET
SUR LE FONCTIONNEMENT ET LA STRUCTURE
DU PHOTOSYSTÈME II DES CHLOROPLASTES D'ORGE

MAI 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

La modification du spectre solaire reliée au dépérissement de la couche d'ozone stratosphérique constitue une menace sérieuse dans la mesure où elle peut occasionner des changements néfastes importants au niveau des écosystèmes terrestres et aquatiques [Smith et coll. (1992), Bornman (1991)]. Dans ce contexte, une simulation de ce phénomène nous a permis de montrer dans ce travail que des intensités faibles de lumière ultraviolette (UV) (204, 226 et 280 nm) peuvent produire des effets délétères significatifs sur la structure et l'activité du photosystème II (PSII). A cette fin, des particules de PSII isolées des thylacoïdes d'orge selon la méthode de van Leeuwen et coll. (1991) ont été utilisées au lieu des chloroplastes afin de permettre une investigation des effets des rayons UV sans l'interférence des mécanismes de réparation.

Nous avons observé que l'irradiation continue des particules de PSII pendant environ 45 min provoque une photo-inhibition irréversible de l'activité de transport d'électrons exprimée sous forme de dégagement d'oxygène en présence de DCBQ (2,6-dichloro-p-benzoquinone) et de la réduction du DCIP (DCIP: 2,6-dichlorophénolindophénol) [Ségui et Fragata (1994)]. L'abolition de la capacité fonctionnelle des particules de PSII se traduit par une décroissance non linéaire de l'activité de transport d'électrons entre 0.5 et 1.0 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$. Cependant, à 2.0 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, cette diminution de l'activité des particules de PSII suit une cinétique de type exponentiel qui est caractérisée par une première étape rapide suivie d'une tendance vers un état stationnaire. Le caractère biphasique de la cinétique de photo-inhibition caractérise à la fois l'hétérogénéité des particules de PSII (PSII_α et PSII_β) et l'hétérosensibilité des cibles des rayons UV dans le photosystème II.

Dans un second temps, les effets des rayons UV sur la structure du PSII ont été étudiés à l'aide des méthodes d'électrophorèse et de spectroscopie UV-visible. Nous avons ainsi

pu observer, d'une part, une perte d'absorbance des protéines colorées et des pigments photosynthétiques. D'autre part, nous avons constaté la dégradation rapide de la protéine D2 et la résistance de celle de 23 kDa vis-à-vis des photons UV de 280 nm. Ces observations constituent des phénomènes tout à fait nouveaux. Par ailleurs, ce comportement de la protéine de 23 kDa permet d'envisager la disposition des protéines extrinsèques à la face lumenale du PSII en accord avec la configuration proposée par Dau (1994) ainsi que Murata et Miyao (1989). Le photoblanchiment de la Chl *a* et des caroténoïdes observé après 90 min d'exposition (280 nm, $2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) est plus accentué que celui de la Chl *b* et de la Phé. Les différences de spectres électroniques prouvent que les pigments photosynthétiques localisés dans les antennes sont probablement plus sensibles aux rayons UV. La photo-oxydation rapide des caroténoïdes peut être reliée au changement d'environnement subi par les complexes de PSII.

En outre, nous avons déterminé que d'une manière générale la photomodification structurale est très lente par rapport à la photo-inhibition de l'activité photosynthétique. Cela sous-entend que dans nos conditions expérimentales, la perte de la capacité fonctionnelle résulte des changements conformationnels qui s'opèrent au niveau des cibles moléculaires dans le complexe PSII. Ces changements de conformation ont été étudiés à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Nous avons observé que ces changements impliquent particulièrement le groupement fonctionnel C=O des protéines. Cette conclusion découle des variations importantes qui sont observées dans la région de $1800 \text{ à } 1600 \text{ cm}^{-1}$ dans les spectres FTIR. De plus, les variations négatives observées dans la région de 1515 cm^{-1} des spectres infrarouge peuvent constituer une indication de la photomodification causée par les rayons UV de la chaîne latérale de la tyrosine Tyr_Z du centre réactionnel du photosystème II [Gabashvili, Menikh, Ségui et Fragata (1998)].

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier sincèrement le Prof. Mario Fragata de m'avoir accepté dans son laboratoire et de diriger ce projet du début jusqu'à la fin.

Ma profonde gratitude va aux instances supérieures de l'UQTR qui ont su à chaque instant, mener mon dossier avec franchise et impartialité. Cette reconnaissance va aussi à l'endroit du Prof. Robert Carpentier qui m'a généreusement permis l'accès à son laboratoire durant tout mon travail. Un très grand merci à Madame Johanne Harnois qui a consacré beaucoup de son temps à mes expériences d'électrophorèse. Je voudrais que cette pensée particulière touche également les Profs. Pazdernik (UQTR), Kaye (NASA), Nénonéné (NWU-Chicago) et bien d'autres dont les encouragements, ainsi que leurs explications m'ont fortement aidé dans l'élaboration de cette thèse.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du jury d'avoir accepté sans hésitation d'examiner cette thèse.

A tous mes nombreux amis Québécois (surtout le Père Maurice Pellerin du Presbytère St-Laurent de Trois-Rivières) qui m'ont aidé moralement et financièrement durant les périodes les plus tristes de cette thèse, je voudrais vous dire simplement merci.

Finalement, un grand merci à "l'Histoire du Peuple Noir" (celle de la Négritude, de Martin L. King, des 28 ans de prison de Me Nelson Mandela) qui n'a pas cessé de me rappeler que tout africain digne de ce nom se doit avant tout respecter l'être humain, mais aussi ne doit jamais reculer face à la haine et au mépris même si le prix final est son sang.

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLES DES MATIERES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES DES SYMBOLES ET ABBREVIATIONS	xiii
 CHAPÎTRE I - INTRODUCTION	 1
I.1 Aperçu du processus de photosynthèse	1
I.2 État des travaux	8
I.3 Objectif du travail	12
 CHAPÎTRE II – STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT	
DU PHOTOSYSTEME II	17
II.1. Organisation structurale	17
II.1.1. Centre réactionnel du PSII	21
II.1.2. Antennes collectrices de lumière	23
II.1.3. Les protéines extrinsèques	24
II.1.4. Centre de manganèse	24
II.1.5. Pigments et quinones	27
II.2. Aspect fonctionnel	30
II.2.1. Processus de transfert d'électrons	30
II.2.2. Transfert d'électrons dans le photosystème II	30
 CHAPITRE III – MATERIEL ET METHODES	 34
III.1. Produits chimiques	34

III.2. Culture des plantules d'orge	35
III.3. Méthode d'isolement du PSII	35
III.4. Méthodes de caractérisation des effets de la radiation UV	38
III.4.1. Irradiation UV des échantillons de PSII	38
III.4.2. Mesure de l'activité de dégagement d'oxygène	40
III.4.3. Transfert d'électrons: réduction du DCIP	43
III.4.4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	44
III.4.5. Méthodes spectroscopiques	47
III.4.5.1. Spectroscopie UV-visible	47
III.4.5.2. Spectroscopie infrarouge	48
 CHAPÎTRE IV – EFFET DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET SUR LE	
PHOTOSYSTEME II : ASPECT FONCTIONNEL	51
IV.1. Résultats	51
IV.1.1. Efficacité relative du DCBQ et du DCIP dans le dégagement d'oxygène du PSII non irradié avec de la lumière UV	51
IV.1.2. Effet de la radiation UV sur les activités de dégagement d'oxygène et de réduction du DCIP	51
IV.1.3. Effet de l'intensité de lumière incidente UV sur l'activité du PSII	62
IV.1.4. Relation entre l'état physiologique du PSII et le degré de photoinactivation	67
 IV.2. Discussion	69
IV.2.1. Effets du rayonnement UV sur les pièges d'énergie dans le PSII	69
IV.2.2. La théorie des cibles d'Altman et coll. (1970)	72
IV.2.3. Cibles moléculaires potentielles des rayons UV: côté accepteur d'électrons et centre réactionnel	75
IV.2.4. Cibles moléculaires potentielles des rayons UV: côté donneur d'électrons	82

IV.2.5. Autres effets du rayonnement UV dans la photoinactivation du PSII	89
--	----

CHAPÎTRE V – EFFET DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET SUR LE PHOTSYSTÈME II: ASPECT STRUCTURAL 92

V.1. Résultats	92
V.1.1. Effet du rayonnement UV sur les pigments photosynthétiques	92
V.1.2. Caractérisation, à l'aide d'électrophorèse SDS-PAGE, de l'effet des rayons UV sur les polypeptides du PSII	101
V.1.3. Etude, à l'aide de spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier, de l'effet des rayons UV	105
V.1.3.1. Théorie sur la spectroscopie infrarouge et des modes vibrationnels de la liaison peptidique	105
V.1.3.2. Identification des modes vibrationnels et des structures secondaires des polypeptides du PSII	113
V.1.3.3. Caractérisation des effets du rayonnement UV sur les polypeptides du PSII	124
V.2 Discussion	136
V.2.1. Les pigments photosynthétiques	136
V.2.2. Les polypeptides du complexe PSII	138
V.2.3. Les modes vibrationnels du PSII	141

CHAPÎTRE VI – DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION 148

CHAPÎTRE VII – BIBLIOGRAPHIE 153

LISTE DES TABLEAUX

1. Composition des protéines et des pigments photosynthétiques dans le complexe de photosystème II d'épinard	19
2. Photoinhibition de l'activité de transfert d'électrons de fragments membranaires de PSII après 45 min d'irradiation	61
3. Simulation du dépérissement de la couche d'ozone stratosphérique : photoinhibition de l'activité de dégagement d'oxygène de fragments membranaires de PSII après 45 min d'irradiation	66
4. Effets des radiations UV (280, 226 et 204 nm) sur les pigments photosynthétiques majeurs du PSII après 45 d'irradiation	99
5. Effets des radiations UV (280, 226 et 204 nm) sur les pigments photosynthétiques majeurs du PSII après 90 d'irradiation	100
6. Effet de la radiation UV à 280 nm sur quelques protéines majeures du complexe du PSII	103
7. Bandes vibrationnelles du complexe de PSII natif dans la région de 4000-1000 cm^{-1}	116
8. Bandes amide I (1700-1590 cm^{-1}) de fragments membranaires de PSII natif : localisation des structures secondaires	119
9. Bandes amide I (1700-1590 cm^{-1}) de quelques protéines non photosynthétiques: localisation des structures secondaires	123

LISTE DES FIGURES

1. Modèle de la structure d'un chloroplaste	2
2. Modèle de la membrane des thylacoïdes avec la distribution des photosystèmes	6
3. Modèle de l'organisation générale de la membrane des thylacoïdes	7
4. Caractéristiques spectroscopiques d'éventuelles cibles moléculaires des radiations UV dans le PSII	14
5. Modèle architectural du PSII	20
6. Structures des polypeptides D1 et D2 du centre réactionnel du PSII	22
7. Modèle de la structure du complexe de manganèse (Mn) dans le PSII	26
8. Structures chimiques de quelques chromophores du PSII	29
9. Schémas de transfert d'électrons dans la membrane des thylacoïdes et dans le PSII	33
10. Schéma du dispositif d'irradiation des échantillons avec de la lumière UV	39
11. Mesure typique de l'activité de dégagement d'oxygène (ADO) des particules de PSII incubées dans la solution BTS400	42
12. Densitogramme d'un gel d'électrophorèse de PSII natif	46

13. Schéma du dispositif de préparation de films de PSII utilisés pour la mesure de spectres infrarouges	50
14. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière à UV 280 nm en présence de DCBQ	53
15. Graphes de la variation de l'activité de réduction de DCIP en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière à 280 nm	55
16. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière à UV 226 nm en présence de DCBQ	57
17. Graphes de la variation de l'activité de réduction de DCIP en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière à 226 nm	58
18. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière à UV 204 nm en présence de DCBQ	59
19. Graphes de la variation de l'activité de réduction de DCIP en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière à 204 nm	60
20. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII en présence de DCBQ	65
21. Modèle de la structure du centre réactionnel du photosystème II	87
22. Spectre d'absorption des particules de PSII natif incubées dans	

la solution BTS400 et dérivée seconde du spectre d'absorption	94
23. Spectre d'absorption des particules de PSII natif et différence de spectres d'absorption (DA) obtenus après 90 min d'irradiation à 280 nm	96
24. Perte relative d'absorbance des particules de PSII non irradiées (NI) et exposées à la radiation UV à 280 nm	97
25. Modèle de l'interaction de la radiation électromagnétique infrarouge avec une molécule diatomique	107
26. Modes de vibration dans l'infrarouge : représentation schématique d'un groupement triatomique covalent AXY	108
27. Structure et configuration de la liaison peptidique et modes de vibration fonctions amides	111
28. Quelques structures secondaires des protéines dans le complexe de PSII	112
29. Spectre infrarouge par transformée de Fourier de film amorphe de fragments membranaires de PSII	115
30. Bande de vibration de la fonction amide I du PSII	118
31. Dérivée seconde de spectres FTIR obtenus avec un film amorphe de PSII avant irradiation et après 60 min d'exposition continue à la lumière UV de 280 nm	126
32. Dérivée seconde de spectres FTIR obtenus avec un film amorphe de PSII avant irradiation et après 60 min d'exposition continue à la lumière	

UV de 226 nm	127
33. Dérivée seconde de spectres FTIR obtenus avec un film amorphe de PSII avant irradiation et après 60 min d'exposition continue à la lumière UV de 204 nm	128
34. Changements induits dans les films contrôles de PSII	130
35. Changements induits dans les films de PSII irradiés à 280 nm	133
36. Changements induits dans les films de PSII irradiés à 226 nm	134
37. Changements induits dans les films de PSII irradiés à 204 nm	135
38. Effets spécifiques du rayonnement monochromatique UV après 60 min d'irradiation des particules de PSII	143
39. Spectres FTIR du PSII et de la tyrosine libre dans la région de 1700-1500 cm ⁻¹	147A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABBREVIATIONS

A	Absorbance
ADO	Activité de dégagement d'oxygène
(-) cm⁻¹	Bande de vibration négative
(+) cm⁻¹	Bande de vibration positive
Car	Caroténoïde
Chl	Chlorophylle
CMn	Complexe de Mn
C-PSII	Complexe-cœur ('Core complex') du PSII
CR	Centre réactionnel
CR-PSII	Centre réactionnel du PSII
D	Dérivée seconde
F	Force
ft	Feuillet
FTIR	Infrarouge par transformée de Fourier
His	Histidine
I_{inc}	Intensité incidente de lumière
λ	Longueur d'onde
λ_{ir}	Longueur d'onde d'irradiation.
LHC	"Light Harvesting Complex" (antenne collectrice de photons)
N	Nombre de mole d'un réactif (nDCBQ: nombre mole de DCBQ)
NI	Non irradié
Ø^r	Différence relative de spectres
Phé	Phéophytine
PS	Photosystème (PSI ou PSII)
Q	Quinone
s.n.d.	Structure non identifiée
t_{ir}	Temps d'irradiation

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I.1. Aperçu du processus de photosynthèse

La majorité des systèmes biologiques sur la planète Terre dépendent de l'absorption de la radiation solaire visible qui leur permet de biosynthétiser des structures très élaborées. Une partie importante de cette énergie s'intègre dans la biosphère par la voie de la photosynthèse, laquelle règle la production végétale. L'interaction de la radiation solaire avec les organismes photosynthétiques donne lieu à une multitude d'effets de nature fonctionnelle car l'énergie solaire non seulement constitue la force motrice de la photosynthèse, mais aussi déclenche et régule les réponses morphogéniques chez les végétaux supérieurs [Melis et coll. (1992), Govindjee et Coleman (1990)].

D'une façon succincte, la photosynthèse observée dans le monde végétal a lieu plus particulièrement dans les feuilles vertes, et spécifiquement dans les chloroplastes [Lawlor (1987), Gregory (1989), Govindjee et Coleman (1990), Wolfe (1993), Kohen et coll. (1995)]. Une unité chloroplastique fonctionnelle est constituée essentiellement de la membrane photosynthétique (les thylacoïdes et les membranes stromatiques). La membrane thylacoïdienne consiste en une assise ramifiée à l'intérieur du stroma où elle présente des régions empilées ou disques granaires [Foyer (1984)]. Les lamelles stromatiques relient les grana les uns aux autres [Foyer (1984)]. Ces membranes sont constituées essentiellement d'une bicouche lipidique qui renferme un certain nombre de complexes protéiniques et pigment-protéiniques. La membrane thylacoïdienne limite deux régions. Le stroma est à l'extérieur et le lumen à l'intérieur. Un modèle typique de la structure du chloroplaste est présenté à la **figure 1**.

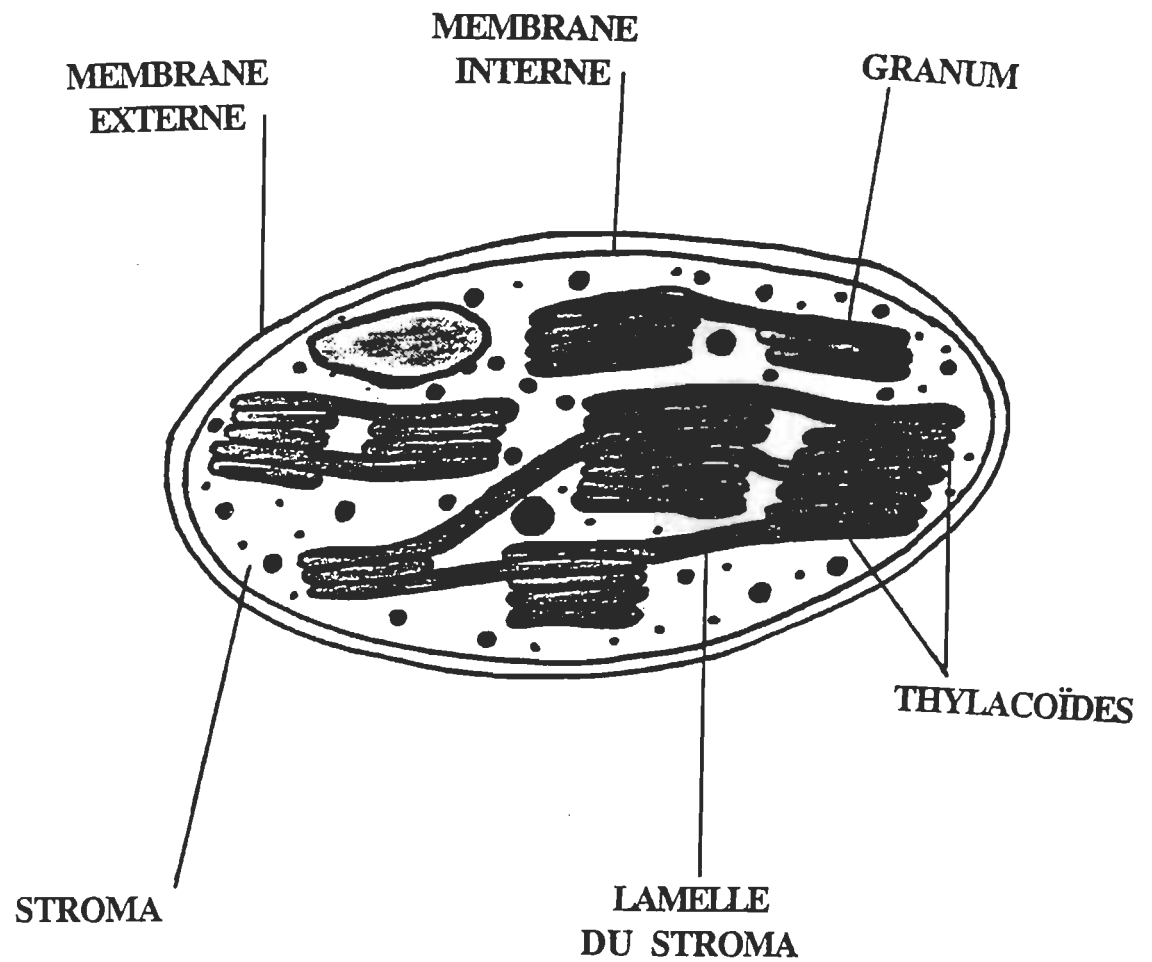


Figure 1. Modèle de la structure d'un chloroplaste [Bowe (1996)].

La photosynthèse dans le monde végétal est le processus par lequel les plantes supérieures produisent des glucides et de l'oxygène moléculaire (O₂) en utilisant des molécules d'eau et de bioxyde de carbone (CO₂) [Wolfe (1993), Lawlor (1987), Foyer (1984)]. La représentation la plus générale du processus photosynthétique est donnée par l'équation [Hall et Rao (1972)]



qui schématise la biosynthèse du glucose à partir de CO₂ et H₂O. La réduction du bioxyde de carbone en glucose conjointe à l'oxydation de l'eau en oxygène moléculaire (O₂) ne peut se produire que si l'énergie nécessaire est fournie sous forme de radiation solaire [Gregory (1989), Hall et Rao (1972), Lawlor (1987)]. Bien que la réaction globale de conversion de CO₂ en glucose soit appelée photosynthèse, la lumière n'intervient en fait que dans quelques uns des premiers stades.

La photosynthèse chez les plantes supérieures comporte deux grandes étapes distinctes qui se produisent dans le chloroplaste. Les réactions photochimiques primaires (transfert d'électrons et phosphorylation) sont reliées au système interne de la membrane des thylacoïdes tandis que les enzymes de fixation de carbone sont localisées dans le stroma du chloroplaste. Bien que la réduction du CO₂ ne constitue pas notre centre d'intérêt dans cette étude, il s'avère néanmoins pertinent de donner un aperçu de la phase obscure de la photosynthèse laquelle conduit à la synthèse du glucose dans le stroma.

La partie obscure (en absence de lumière) correspondant à la régulation de l'assimilation du CO₂ photosynthétique est un processus complexe dans lequel le phosphate inorganique joue un rôle clé [Trebst et Avron (1977)]. Il suit le cycle réducteur du pentose-phosphate qui présente trois phases. La première phase en est une de carboxylation impliquant la phosphorylation du ribulose-5-phosphate en ribulose 1,5-

diphosphate. À son tour, ce dernier se combine avec du CO_2 et donne ainsi origine à deux molécules de 3-phosphoglyceraldéhyde. La seconde phase consiste en un renversement de deux réactions de glycolyse. Au cours d'une de ces réactions, chacune des deux molécules de phosphoglycérate est phosphorylée pour donner du 1,3-diphosphoglycérate grâce à la kinase phosphoglycérate. Dans l'autre réaction, le 1,3-diphosphoglycérate est réduit en glyceraldéhyde-3-phosphate par la déshydrogénase-3-phosphate. Finalement, dans la troisième phase le ribulose-5-phosphate est régénéré à partir du glyceraldéhyde-3-phosphate par les enzymes du cycle du pentose-phosphate. Le glyceraldéhyde-3-phosphate restant est converti en amidon. Six tours du cycle sont nécessaires pour fournir une molécule de glucose qui se polymérise par la suite en amidon. La description détaillée de la partie obscure de la photosynthèse est présentée, par exemple, dans les ouvrages de Trebst et Avron (1977), Lawlor (1987), Briggs (1989) et Wolfe (1993).

Comme mentionné ci-dessus, le processus de photosynthèse en phase lumineuse auquel nous allons nous intéresser dans ce travail est composé de plusieurs séquences de réactions physico-biochimiques qui ont lieu à l'intérieur de la membrane thylacoïdienne. L'énergie lumineuse capturée sous forme de quanta de lumière par les feuilles des plantes supérieures peut être dissipée sous forme de fluorescence, phosphorescence et d'énergie thermique. La proportion relative qui est convertie en énergie chimique permet ainsi la réalisation de la photosynthèse [Gregory (1989), Lawlor (1987)]. En fait, cette conversion énergétique de la lumière dans l'appareil photosynthétique consistant en une transformation de l'énergie des photons en énergie chimique est la somme de l'énergie des nouvelles liaisons formées au cours de l'assimilation du CO_2 [Gregory (1989), Foyer (1984), Hall et Rao (1972), Lawlor (1987)]. La réalisation de cette partie de la photosynthèse dans la membrane thylacoïdienne nécessite principalement la présence de deux types de complexes protéiniques appelés communément photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII) [Hansson et Wydrzynski (1990), Svensson et coll. (1991), Werst et coll. (1992), Lin et coll.

(1992), Hashimoto et coll. (1993), Gobets et coll. (1994)]. D'une façon particulière, les travaux d'Albertsson et coll. (1990), Guenther et Melis (1990), Svensson et coll. (1991), van Wijk et coll. (1993) et Park et coll. (1995, 1996) traitent de l'hétérogénéité des photosystèmes et ont apporté des précisions sur la localisation et la catégorisation de ces derniers dans la membrane thylacoïdienne. Les sous unités de type α (PSI_{α} et PSII_{α}), c'est-à-dire les particules de plus grande taille, sont situées dans les disques granaires alors qu'on retrouve celles de type β (PSI_{β} et PSII_{β}) dans les lamelles du stroma. La **figure 2** montre un modèle de la distribution de ces deux sortes de populations de photosystèmes dans la membrane des thylacoïdes. Il faudrait aussi noter l'existence de photosystèmes non réducteurs de quinones [Guenther et Melis (1990), van Wijk et coll. (1993), Park et coll. (1995, 1996)] qui ne sont pas représentés dans le modèle de Svensson et coll. (1991). Outre les deux photosystèmes et leurs complexes collecteurs mobiles de lumière, ou "light harvesting complex" (LCH: LCHI et LCHII), la membrane photosynthétique contient entre autres un complexe de cytochrome b_6/f (Cyt- b_6/f), une ATP synthétase avec son facteur de couplage $\text{CF}_0\text{-CF}_1$ et un "pool" de plastoquinones [Bassi et coll. (1990), Hansson et Wydrzynski (1990), Ruban et coll. (1992a), Dau (1994), Wolfe (1993)]. La présence de tous ces complexes activés directement ou indirectement par la lumière est indispensable pour assurer le métabolisme cellulaire [Wolfe (1993)]. Un modèle de l'organisation moléculaire de la membrane photosynthétique des thylacoïdes est présenté à la **figure 3**.

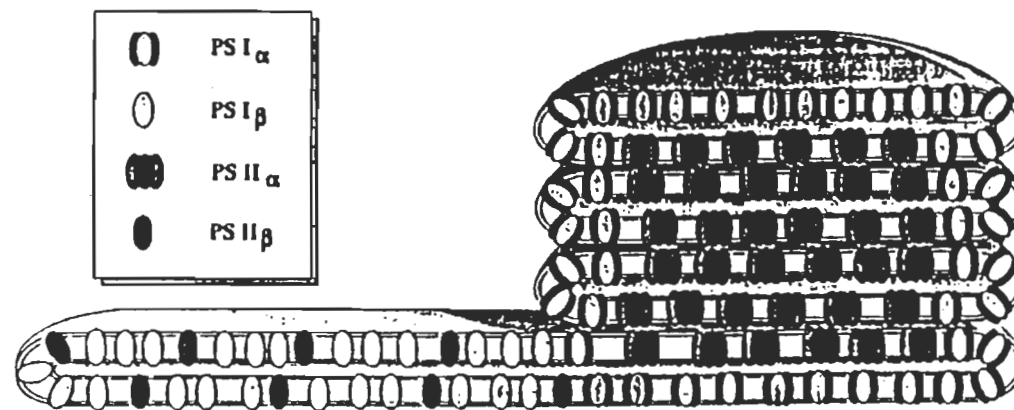


Figure 2. Modèle de la membrane des thylacoïdes avec la distribution des photosystèmes [Svensson et coll. (1991)].

Cependant, en dépit de son rôle indispensable de force motrice de la photosynthèse, la radiation solaire présente certains aspects nuisibles au développement des plantes supérieures dont les plus importants sont les hautes intensités de la lumière visible [Powles (1984), Godde et coll. (1992), Demeter et coll. (1987), Jegerschöld et coll. (1990), Virgin et coll. (1990), Jegerschöld et Styring (1991), Kirilovsky et Etienne (1991), Richter et coll. (1990), Aro et coll. (1993), Park et coll. (1995, 1996), Sinclair et coll. (1996)] et du rayonnement ultraviolet (UV) [Tevini et Teramura (1989), Smith (1989), Renger et coll. (1989, 1991), Bornman et coll. (1984), Bornman (1986, 1989, 1991), Melis et coll. (1992), Greenberg et coll. (1989), Barbato et coll. (1995), Frisco et coll. (1993, 1994, 1995)].

C'est la composante ultraviolette de la radiation solaire qui constitue notre point d'intérêt dans ce travail. On ne saurait donc commencer une véritable étude des effets des radiations UV sur le processus de photosynthèse sans mentionner quelques travaux d'envergure réalisés par certains pionniers.

I.2. État des travaux

Afin d'étudier en profondeur le processus de la photosynthèse, Costes (1978) a mesuré l'activité de dégagement d'oxygène de la *Chlorelle*, une algue unicellulaire, avec lumière visible et ultraviolet jusqu'à 220 nm. Hélas, le rendement quantique de la photosynthèse s'est avéré nettement trop faible en raison des réactions de photoinhibition qui ont lieu simultanément. Après, les études des effets du rayonnement UV susceptibles de modifier les manifestations caractéristiques de l'activité photosynthétique ont pris de l'ampleur au cours de ces deux dernières décennies.

Les effets des radiations UV sur les organismes photosynthétiques observés dans la nature sont en majorité reliés au dépérissement de la couche d'ozone stratosphérique, lequel est attribué aux polluants atmosphériques tels que les chlorofluorocarbones [Jokela et coll. (1995), Smith et coll. (1992), McFarland et Kaye (1992), Storlarski et coll. (1992),

Bornman (1991), van der Leun (1990), Scotto et coll. (1988), Worrest et Caldwell (1986), Farman et coll. (1985), Molina et Rowland (1974)]. Cette émission des polluants provoque la transparence de l'atmosphère aux rayonnements électromagnétiques UV de courtes longueurs d'onde. Néanmoins, jusqu'à ce jour la grande majorité des études d'impact des radiations UV sur les systèmes biologiques se sont limitées à la région de l'UV-B (280-320 nm). Cela s'explique par le fait que la quantité de rayonnements de très courtes longueurs d'onde (UVC: < 280 nm) arrivant à la surface de la Terre s'avère négligeable [Molina et Rowland (1974), Smith (1989), Häder et Tevini (1987), Renger et coll. (1989), Urbach (1991)]. Ces photons sont complètement absorbés par l'ozone et l'oxygène dans l'atmosphère [Kohen et coll. (1995)].

Bien qu'elle constitue environ 1.5 % de la totalité de l'émission en énergie solaire, la radiation ultraviolette (320-200 nm) a un impact majeur sur la vie terrestre à travers une multitude effets adverses [Frederick et coll. (1989), Murphy (1983), Teramura (1983), Melis et coll. (1992)]. En effet, la lumière UV-B peut, après absorption dans les cellules végétales, causer des dommages au niveau des molécules comme l'ADN, les protéines, les pigments photosynthétiques et les intermédiaires de transport d'électrons (quinones) [Melis et coll. (1992)]. Elle a la capacité d'altérer les voies métaboliques de même que la structure et le développement des organismes vivants. La lumière UV-B peut aussi modifier les interactions entre les différentes espèces dans les écosystèmes [Tevini et Teramura (1989), Kulandaivelu et Noorudeen (1983), Bornman (1989), Panagopoulos et coll. (1990), Sullivan et Teramura (1989), Gala et Giesy (1991), Hada et coll. (1993), Nielsen et coll. (1995), Helbling et coll. (1992), Smith et coll. (1992), Cullen et Lesser. (1991)]. Pour donner un exemple précis, soulignons que Panagopoulos et coll. (1990) ont montré que l'irradiation des plantules de canne à sucre âgées d'une semaine avec un mélange de lumière visible (350-700 nm) et UV-B (flux de photons de $2.43 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) produit des effets nocifs sur leur croissance, provoquant une perte en poids des racines et des feuilles. Dans

les mêmes conditions, ils ont observé une réduction de la teneur en chlorophylle a (Chl a) et Chl b d'environ 32 et 18 % respectivement. En outre, les effets délétères des radiations UV sur les plantes et les feuilles entières mesurés par Desai (1990) montrent que la composante lente de fluorescence retardée et l'activité du PSII dans les chloroplastes ainsi que dans les feuilles de *Pothos* sont inhibées en irradiant les échantillons avec une intensité de $10.8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ de lumière UV (271 nm), et ce pour une période d'environ 3 à 8 minutes. Desai (1990) a aussi remarqué que l'activité du PSI n'a été que très légèrement affectée. Cette approche permet d'étudier les conséquences globales du "stress" causé par le rayonnement UV-B parce qu'elle comprend tous les effets destructeurs et protecteurs provenant des cibles externes à l'appareil photosynthétique [Renger et coll. (1991)]. Cependant, l'élucidation des sites et des mécanismes d'action des UV demeure très complexe, voire ambiguë.

Dans un souci de préciser l'interprétation des effets des radiations UV sur les systèmes photosynthétiques, plusieurs chercheurs ont orienté leurs travaux de recherche sur des fractions plus petites telles que les fragments membranaires de thylacoïdes, du photosystème I, et des particules des centres réactionnels du PSI et du PSII. Ainsi, Trebst et Depka (1990) ont montré que la lumière UV de longueur d'onde 254 nm induisait des changements irréversibles dans le centre réactionnel du PSII (CR-PSII) des thylacoïdes d'épinard. Ils ont attribué ces changements aux dommages causés dans la protéine D1 (voir aspect structural dans le **Chapitre II**) qui occasionneraient la perte de l'activité de transport d'électrons dans le complexe protéinique du PSII. La dégradation de la protéine D1 a aussi été observée par Frisco et coll. (1995, 1994) et Greenberg et coll. (1989). Quoiqu'une perte de la protéine D2 ait été rapportée par Trebst et Depka en 1990 après une irradiation des membranes de thylacoïdes isolées, aucun fragment de rupture ("breakdown fragments") n'a été détecté. Par contre, Frisco et coll. (1994) ont montré que l'ajout de la quinone 2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-p-benzoquinone au milieu d'incubation avant l'exposition

des échantillons aux photons UV-B produit un fragment de 22 kDa à partir de la protéine D2. Ce résultat a été obtenu seulement en utilisant la technique d'immunobuvardage. De la même manière, un fragment de poids moléculaire de même ordre de grandeur (23.5 kDa) a été aussi observé dans le cas de la protéine D1 par Greenberg et coll. (1989). À l'instar de Trebst et Depka (1990), Renger et coll. (1989) ont non seulement observé l'inactivation des particules de PSII, mais aussi suggéré que le centre de manganèse est probablement la cible primaire de la radiation UV-B dans le PSII. D'un autre côté, Melis et coll. (1992) ont montré que l'exposition des fragments membranaires de thylacoïdes aux faisceaux UV composés principalement de longueurs d'onde d'irradiation de 295, 302 et 335 nm diminue la vitesse de transport d'électrons et cause la dégradation des protéines du CR-PSII. Melis et coll. (1992) sont arrivés à la conclusion que le côté stromal est la cible la plus sensible aux radiations UV dans le complexe de PSII.

En dépit de ces progrès considérables, les cibles moléculaires précises des radiations UV et les séquences de réactions affectées dans l'appareil photosynthétique font encore l'objet de nombreuses hypothèses contradictoires dans la littérature. En d'autres mots, toutes les études menées jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier clairement les sites d'action primaire des radiations UV (*cibles moléculaires*) et la réponse des systèmes photosynthétiques aux photodommages, d'où notre intérêt pour ce champ de recherche.

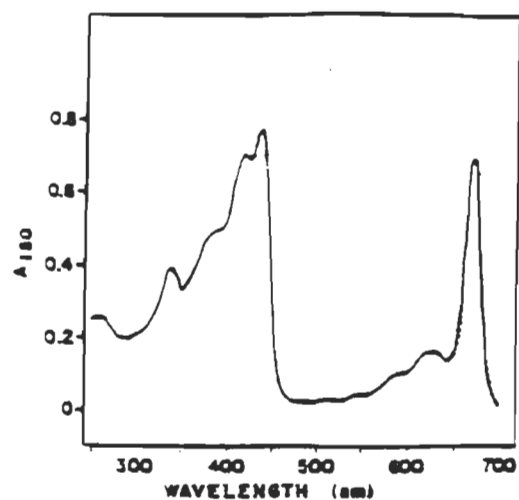
I.3. Objectif du travail

Au cours de ces dernières années, l'intérêt que suscite la région ultraviolette du spectre solaire en photobiologie proviendrait des diverses tentatives effectuées par plusieurs groupes de recherche en vue de comprendre les conséquences possibles de la réduction de la couche d'ozone stratosphérique liée aux polluants atmosphériques produits par l'homme (voir **section I.2** en haut). À ce chapitre, les organismes photosynthétiques, et particulièrement le photosystème II, présentent un intérêt spécial parce qu'ils jouent un rôle clé dans la survie de toute la biosphère.

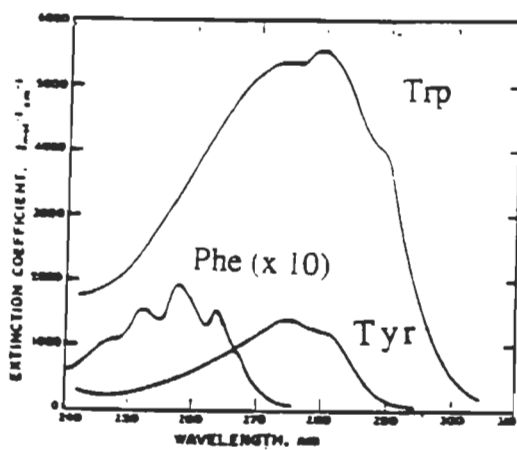
Face aux interprétations contradictoires avancées sur le phénomène de photoinhibition causée par la radiation UV, nous nous proposons dans ce travail d'étudier les effets possibles de faibles intensités de ce rayonnement électromagnétique UV sur l'organisation moléculaire et le fonctionnement du complexe de PSII des chloroplastes d'orge. De plus, dans une optique de caractérisation rigoureuse des mécanismes d'action et de localisation précise des cibles primaires des UV dans le PSII, nous avons choisi de travailler avec des faisceaux monochromatiques. Cela nous permettra d'éviter l'excitation d'un grand nombre de chromophores à la fois.

Notre objectif est principalement l'utilisation de la longueur d'onde de 280 nm. La particularité de cette longueur d'onde provient du fait qu'elle constitue la zone critique, c'est-à-dire, la frontière entre les régions UV-B et UV-C du spectre solaire telles que définies par "l'Association Internationale de Photobiologie". En irradiant des particules de PSII à 280 nm, nous espérons atteindre d'une part certains radicaux d'acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) qui font partie des polypeptides extrinsèques de l'enzyme de dégradation de l'eau [Ghanotakis et Yocum (1985), Xu et coll. (1994)] et des protéines D1 et D2 [Barry et Babcock (1987), Svensson et coll. (1990)], et d'autre part les pigments photosynthétiques qui constituent les complexes pigment-protéines [Fragata et coll. (1988), Smith (1989)].

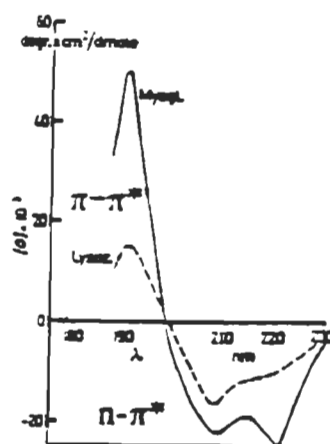
En second lieu, nous nous sommes proposés de simuler une réduction très sévère de l'opacité de la couche atmosphérique, d'où l'utilisation des faisceaux monochromatiques de 226 et 204 nm. À travers cette démarche, nous espérons montrer l'effet des faibles doses de radiation UV sur le squelette des protéines, car la liaison peptidique présente des transitions électroniques $n-\pi^*$ et $\pi-\pi^*$ respectivement dans la région de 226 et 204 nm [Jirgensons (1973)]. Les caractéristiques spectrales de quelques chromophores visés dans ce travail sont présentées à la **figure 4**.



A



B



C

Figure 4. Caractéristiques spectroscopiques d'éventuelles cibles moléculaires des radiations UV dans le PSII: A) spectre d'absorption de la Chl *a* [Fragata et coll. (1988)], B) spectres d'absorption des acides aminés aromatiques en solution aqueuse [Smith (1989)] et C) Courbes d'ellipticité de protéines [Jirgensons (1973)].

De prime abord, notre choix des particules de PSII comme matériel de recherche dans ce travail découle de plusieurs raisons qui sont discutées ci-dessous :

(i) Plusieurs données expérimentales appuient le concept que le PSII semble le photosystème le plus sensible aux radiations UV par le truchement de son implication dans la photoinhibition du processus photosynthétique [Noorudeen et Kulandaivelu (1982), Iwanzik et coll. (1983), Bornman (1989)].

(ii) Aussi, selon Renger et coll. (1991), les actions des UV-B sur les particules de PSII sont directement menées sans interférence d'autres processus comme ceux rencontrés avec les feuilles entières et les chloroplastes.

(iii) Enfin, les sites d'action primaire (*cibles moléculaires*) des radiations UV et les mécanismes responsables de la photoinhibition demeurent encore énigmatiques dans la mesure où ils sont probablement différents de ceux reliés à la lumière visible.

Ensuite, l'approche expérimentale adoptée dans cette étude en vue de la caractérisation des effets des radiations UV sur les fragments membranaires de PSII se présente en trois volets :

(1) Dans un premier temps, nous étudierons l'action de ces radiations UV sur l'intégrité fonctionnelle des fragments membranaires de PSII; cela se traduira par la mesure de l'activité de transport d'électrons sous forme de réduction de DCIP et de dégagement d'oxygène en présence de DCBQ.

(2) En second lieu, à l'aide des méthodes spectroscopiques nous caractériserons les changements électroniques et structuraux survenant au niveau des composantes moléculaires du PSII; ainsi, d'une façon plus spécifique, nous étudierons les effets des radiations UV sur les pigments photosynthétiques à l'aide de la spectroscopie UV-Visible tandis que l'infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) nous permettra de mettre en

évidence les changements éventuels qui surviendront au niveau des conformations et dans l'environnement des complexes pigment-protéines.

(3) Finalement, les modifications globales espérées dans les polypeptides seront étudiées à l'aide de la technique d'électrophorèse SDS-PAGE (voir **Chapitre II**).

CHAPITRE II

STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT

DU PHOTOSYSTÈME II

II.1. Organisation structurale

À cause de l'importance de son rôle dans le processus de photosynthèse et aussi de la complexité de sa structure, le PSII demeure l'une des sous-unités de la membrane photosynthétique les plus étudiées. Sa structure exacte demeure actuellement une source de conflit dans la littérature. Carpenter et Vermass (1989), Hansson et Wydrzynski (1990), Dekker et coll. (1990) et Holzenburg et coll. (1993) présentent le PSII comme un monomère, alors que Peter et Thornber (1991), Lyon et coll. (1993), Santini et coll. (1994), Boekema et coll. (1995) rapportent qu'il existerait sous forme de dimère. Quoiqu'il en soit, d'après les travaux de Murata et Miyao (1989), Babcock et coll. (1989), Hansson et Wydrzynski (1990), Bassi et coll. (1990), Andersson et Styring (1991), Hashimoto et coll. (1993) et Dau (1994), le complexe macromoléculaire de PSII serait composé globalement de 20 à 25 polypeptides, de pigments photosynthétiques, d'intermédiaires de transfert d'électrons, de lipides et d'ions inorganiques. Le **tableau 1** présente la composition moléculaire du complexe de PSII. Sa masse moléculaire totale est de plus de 400 kDa. Il contient entre 200 et 300 molécules de chlorophylle (Chl a + Chl b), avec environ 30 % de Chl b.

Toutes les molécules et ions inorganiques décrits dans le **tableau 1** sont arrangés dans la membrane photosynthétique selon un schéma structural et géométrique bien déterminé qui peut être représenté par le modèle proposé par Dau en 1994 (voir **figure 5**). Une vue d'ensemble de ce modèle permet de noter que le PSII est composé de plusieurs portions bien distinctes. Une partie transmembranaire qui comprend le centre réactionnel et l'ensemble

des antennes collectrices de photons. Une seconde portion extramembranaire baignant dans le lumen constitue l'ensemble des protéines extrinsèques. Une troisième partie mise en "sandwich" par les protéines extrinsèques et le centre réactionnel représente le complexe de manganèse ou enzyme de dégradation de l'eau. Finalement, nous retrouvons le "pool" de plastoquinones à la face stromale du PSII.

La description sommaire que nous venons de faire donne une vue d'ensemble du complexe macromoléculaire du PSII. Cependant, il est pertinent d'analyser en plus grand détail chacun de ses systèmes modulaires.

Tableau 1. Composition des protéines et des pigments photosynthétiques dans le complexe de photosystème II d'épinard [Murata et Miyao (1987)].

Composés	Caractéristiques	Stoechiométrie
<u>Protéines du core complexe</u>		
47 kDa	Chl-protéine	1
43 kDa	Chl-protéine	1
34 kDa	protéine D2	1
32 kDa	protéine D1	1
9 kDa]	cyt b-559	2
4 kDa]		2
<u>Protéines extrinsèques</u>		
33 kDa	hydrophile	1
23 kDa	hydrophile	1
18 kDa	hydrophile	1
<u>Complexes capteurs de lumière</u>		
25 et 28 kDa	Chl-protéine	-
<u>Autres protéines</u>		
24 kDa	hydrophobe	-
22 kDa	hydrophobe	-
10 kDa	hydrophobe	-
10 kDa	phosphoprotéine	-
5 kDa	hydrophile	-
<u>Pigments et autres composés</u>		
chl a + b		-200
Pheophytine		2
Plastoquinone		3
Lipides		-300
Mn ²⁺		4

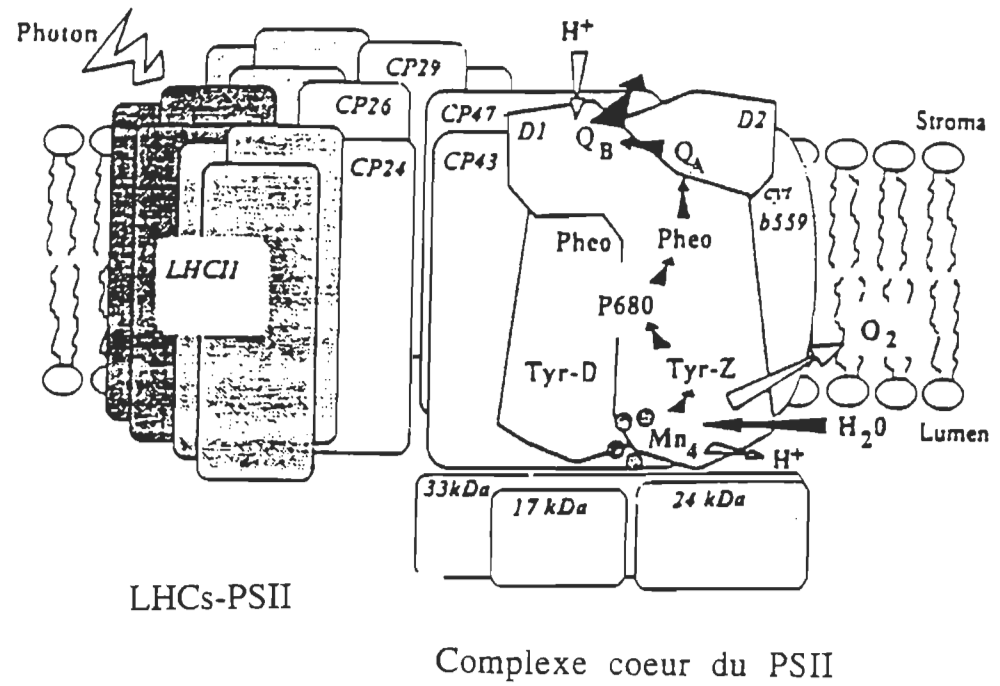


Figure 5. Modèle de la structure du photosystème II [Dau (1994)].

II.1.1. Centre réactionnel du PSII

Un traitement du complexe du PSII avec du triton X-100, suivi d'une chromatographie d'échange d'ions, a permis l'isolement du complexe du centre réactionnel (CR-PSII). Il constitue le coeur du PSII [van Leeuwen et coll. (1991), Satoh (1988), Dau (1994)]. Le CR-PSII est composé de deux protéines de 32 et 34 kDa appelées respectivement D1 et D2. Le CR-PSII contient aussi les deux sous-unités α et β du Cyt_b559 de poids moléculaire apparent respectif de 9 et 4.5 kDa. La terminologie D (protéines D1 et D2) fait référence au caractère diffus des bandes de ces deux protéines dans les gels d'électrophorèse SDS-PAGE colorés avec un mélange Coumassie-urée [Hansson et Wydrzynski (1990)]. Ce centre réactionnel est dénommé complexe D1/D2/Cyt_b559 [Booth et coll. (1990), Kobayashi et coll. (1990), Murata et coll. (1990)]. L'analyse stoïchiométrique indique que le complexe D1/D2/Cyt_b559 contient de la Chl *a*, de la phéophytine (Phé), des caroténoïdes dont le principal est la β -carotène, et des galactolipides dans un rapport moléculaire de 6:2:2:1 [Kobayashi et coll. (1990), Murata et coll. (1990), Eijkelhoff et Dekker (1995)]. Un traitement similaire avec de l'octylglucoside conduit à l'obtention de l'unité minimale du centre de réaction photochimique que l'on nomme D1/D2 [Tang et coll. (1990)]. Plusieurs études biochimiques ont montré que les polypeptides D1 et D2 sont constitués chacun de cinq hélices α similaires traversant complètement la membrane photosynthétique [Debus (1992), Svensson et coll. (1990), Mattoo (1989)]. Les terminaisons amino et carboxylique des séquences extramembraires des hélices α des polypeptides D1 et D2 sont localisées respectivement sur les faces stromale et lumenale du complexe de PSII. Un modèle de la structure des polypeptides D1 et D2 [Svensson et coll. (1990)] est donné dans la **figure 6**.

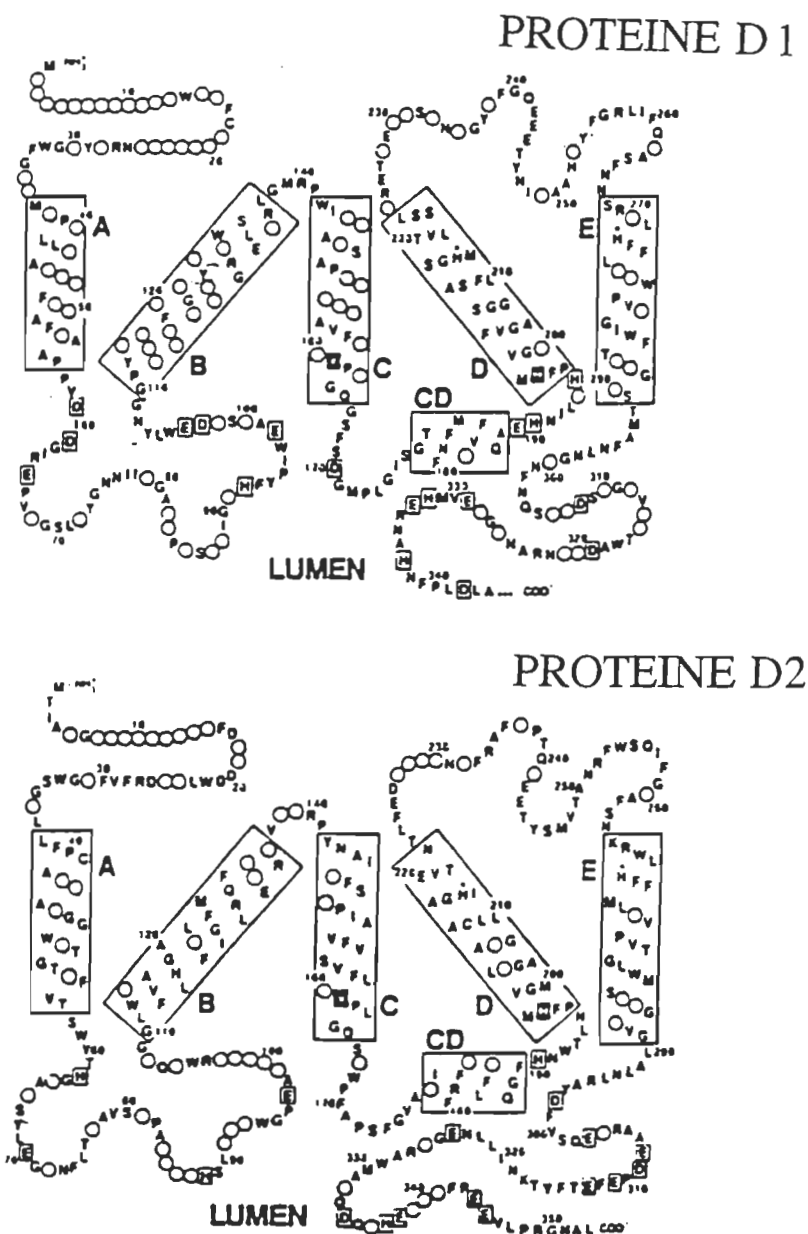


Figure 6. Structures des polypeptides D1 et D2 du centre réactionnel du PSII [Svensson et coll. (1990)].

II.1.2. Antennes collectrices de lumière

Autour du centre réactionnel composé par les protéines D1, D2 et le Cyt_b559, nous observons un premier niveau d'antenne ou antenne proximale. Cette antenne est constituée des complexes chlorophylle-protéines CP47 et CP43 [Hansson et Wydrzynski (1990), Mori et Yamamoto (1992), Dau (1994), Mori et coll. (1995)]. Leurs masses moléculaires apparentes sont de 45 à 51 kDa et de 40 à 45 kDa respectivement. CP47 et CP43 contiennent chacun environ 20 à 25 molécules de Chl *a* et 5 β -carotènes dont l'arrangement demeure inconnu [Haag et coll. (1990), Dau (1994)]. Il existe en apparence des liens chimiques très forts entre l'antenne proximale et le centre réactionnel. Autour de l'antenne proximale, nous observons un second niveau d'antenne ou antenne distale qui constitue la deuxième composante des LHCs ("light-harvesting complexes": complexes collecteurs de lumière). L'antenne distale contient les pigments accessoires en quantité variable. Elle est formée d'au moins deux composantes qui sont la LHCII et l'ACPII ("accessory Chl proteins") [Hansson et Wydrzynski (1990), Kühlbrandt et coll. (1994)]. La LHCII est l'antenne collectrice classique de lumière qui est impliquée dans l'empilement des membranes. Elle est constituée d'environ 75% de tous les polypeptides des LHCs. Cette dernière contient 7 à 9 molécules de Chl *a* et de 6 à 7 Chl *b* et deux lutéïnes par polypeptide monomérique [Kühlbrandt et coll. (1994)]. Cette antenne renferme les protéines de masse moléculaire apparente de 25 et 27 kDa. Quant aux ACPII, elles sont composées de CP29, CP26 et CP24. Les composantes de l'ACPII seraient plus fermement liées à l'antenne proximale et au cœur, ou noyau, du centre réactionnel (C-PSII, ou "PSII core complex") [Hansson et Wydrzynski (1990)].

II.1.3. Les protéines extrinsèques

Trois protéines extrinsèques de poids moléculaire apparent de 33, 24-23 et 18-16 kDa [Dau (1994), Hansson et Wydrzynski (1990), Murata et Miyao (1989)] sont liées à la face interne de la membrane des thylacoïdes. Leur fonction est d'optimiser le dégagement d'oxygène photosynthétique, probablement en fournissant des facteurs structuraux au centre de manganèse (Mn). Parmi les trois protéines extrinsèques, celle de 33 kDa est la plus importante pour l'optimisation de l'activité de dégagement d'oxygène et la stabilisation de la structure du centre de Mn [Hashimoto et coll. (1993)]. La région de la terminaison amino de la protéine de 33 kDa constitue un domaine de liaison à la membrane photosynthétique [Eaton-Rye et Murata (1989), Hansson et Wydrzynski (1990)]. Lorsque la protéine de 33 kDa est structurellement altérée, le PSII perd son intégrité fonctionnelle [Tanaka et Wada (1988)]. La disposition de ces trois polypeptides à la surface de la membrane photosynthétique fait l'objet de plusieurs hypothèses qui sont souvent contradictoires (voir, à ce propos, les modèles proposés par Murata et Miyao en 1989, Hansson et Wydrzynski en 1990, et Dau en 1994).

II.1.4. Centre de manganèse

La structure du complexe de Mn dans lequel il s'accumule quatre équivalents d'oxydation en réponse aux séparations successives de charges qui sont requises pour l'oxydation de l'eau est une partie très importante de la machinerie moléculaire du PSII. Bien qu'elle ait fait l'objet de plusieurs études, sa géométrie exacte n'est cependant pas encore bien connue. Les détails sur l'arrangement spatial du centre de Mn sont décrits dans les travaux de Brudvig et Crabtree (1986), Gregory (1989), Debus (1992), Renger (1993) et Yachandra et coll. (1993). Néanmoins, dans le cadre de cette étude nous optons pour le modèle récent proposé par Yachandra et coll. (1993), modèle autour duquel il semble se

développer un certain consensus. Il a été élaboré à partir de la méthode EXAFS ("Fourier transform of the X-ray absorption fine structure"). Ce modèle est présenté à la **figure 7**. On y voit que le centre de Mn est constitué de deux dimères de Mn assurés par des ponts **di- μ_2 -oxo** qui sont à leur tour reliés par un pont **mono- μ_2 -oxo** et deux connections carboxylate. La distance Mn-Mn dans chaque dimère en pont di- μ_2 -oxo est de l'ordre de 2.7 Å. Par contre, la distance Mn-Mn la plus petite entre les dimères est d'environ 3.3 Å. Ce **complexe de Mn tétranucléaire** comporte des atomes de Cl et Ca ainsi qu'une histidine comme ligands. Cependant la position relative de chaque ligand par rapport aux autres n'est pas encore très bien élucidée.

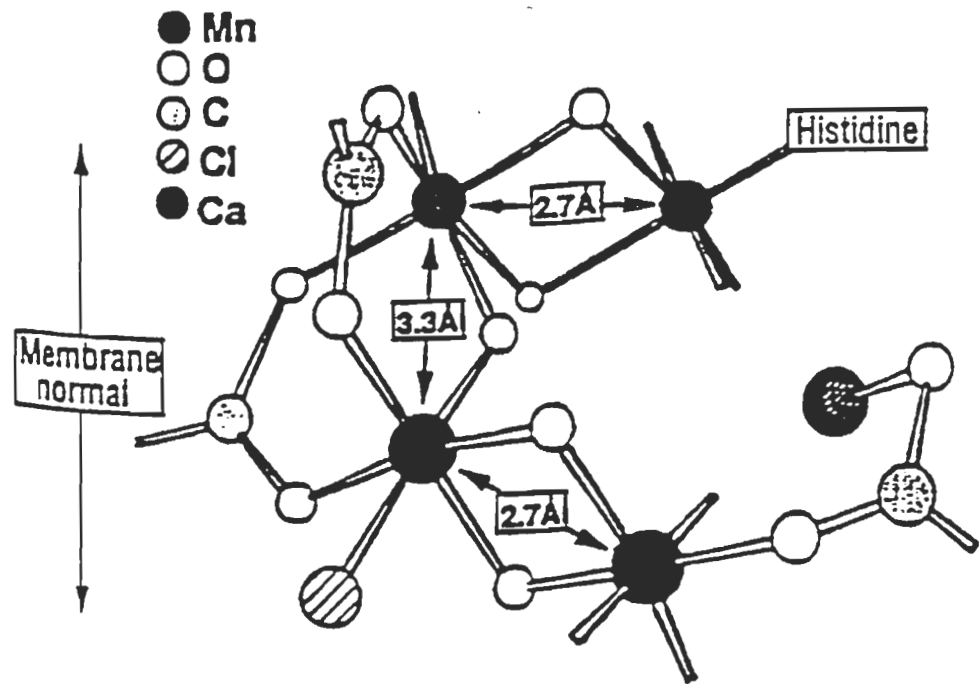


Figure 7. Modèle de la structure du complexe de manganèse (Mn) dans le PSII [Yachandra et coll. (1993)].

II.1.5. Pigments et quinones

Dans les chloroplastes, ce sont les pigments photosynthétiques capteurs de lumière qui opèrent la conversion énergétique dont le siège se trouve dans les membranes granaires ou intergranaires. Parmi ces pigments, la chlorophylle est le pigment le plus abondant dans la membrane photosynthétique. Chez les végétaux supérieurs on en trouve deux type, c'est-à-dire, la chlorophylle a (Chl a) et la Chl b. La molécule de Chl est constituée d'une tête de porphyrine (polaire) tétrapyrrolique et d'une chaîne phytyl. La tête porphyrique contient en son centre un atome de magnésium (Mg). Un autre pigment chlorophyllien que contient le PSII est la phéophytine (Phé). C'est une molécule de chlorophylle dans laquelle le magnésium central est remplacé par deux atomes d'hydrogène. Elle est différente de la Chl a sous plusieurs aspects. La Phé absorbe plus faiblement dans la région du rouge et plus fortement à 505 et 535 nm [Montoya et coll. (1991)]. La Phé existe sous forme de monomère dans le PSII. On en rencontre deux molécules par centre réactionnel [Omata et coll. (1984), Dau (1994), Eijkelhoff et Dekker (1995)].

Outre les pigments chlorophylliens, nous rencontrons dans le PSII des caroténoïdes et des plastoquinones. Le principal caroténoïde du PSII est la β -carotène, un hydrocarbure de structure symétrique possédant 11 doubles liaisons conjuguées qui sont toutes en configuration *trans*. Quant aux plastoquinones, ce sont des parabenzoquinones comportant une chaîne latérale polyisoprénoïde dont la longueur varie entre 20 et 45 atomes de carbone. Selon les travaux de Murata et Miyao (1989), elles se trouvent dans un rapport molaire de 3 : 2 : 0 dans les membranes de PSII, le C-PSII, et le CR-PSII.

La plastoquinone appelée Q_A est liée en permanence à la protéine D2. C'est le second accepteur d'électrons, le premier étant la Phé. Son potentiel fonctionnel est aussi bas que -130 mV. Lorsque Q_A est réduite en Q_A^- un changement d'absorbance est observé à 320 nm. Quant à la Q_B , elle est liée faiblement à la protéine de D1 de 32 kDa. Certaines de ces molécules constituent le "pool" de plastoquinones. Dans le "pool", les molécules de PQ

sont libres de diffuser à l'intérieur de la bicouche lipidique car elles ne sont pas associées aux protéines. Les caractéristiques physico-chimiques de ces molécules photosynthétiques sont décrites en détails dans la littérature [Lawlor (1987), Briggs (1989), Wolfe (1993), Eijkelhoff et Dekker (1995)].

Les structures chimiques de quelques uns de ces chromophores discutés ci-dessus sont présentées à la **figure 8**. Certains détails physico-chimiques concernant ces molécules photosynthétiques seront donnés au fur et à mesure que nous progresserons dans ce travail.

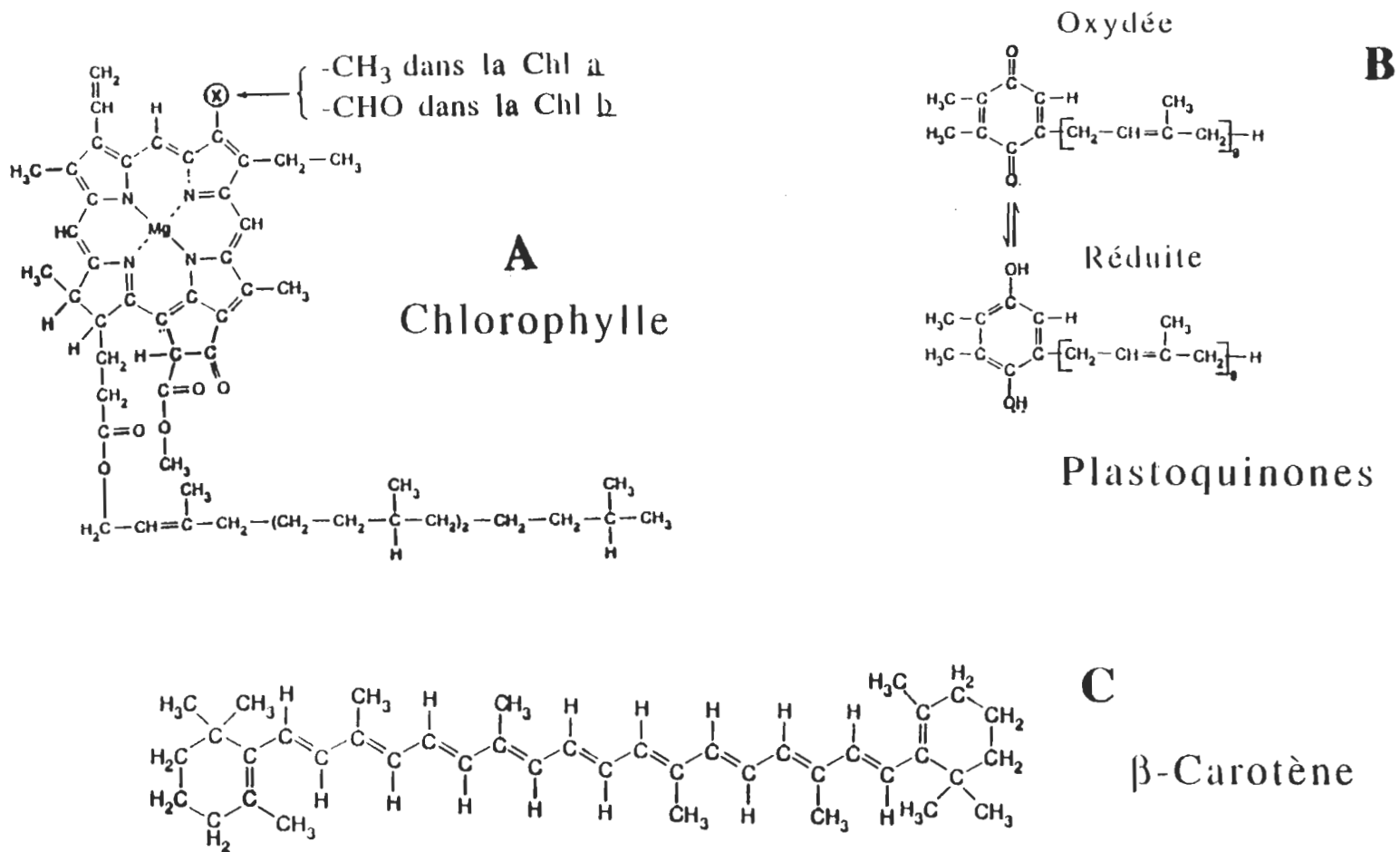


Figure 8. Structures chimiques de quelques chromophores du PSII.
A) Chlorophylle, B) plastoquinones et C) β -carotène.

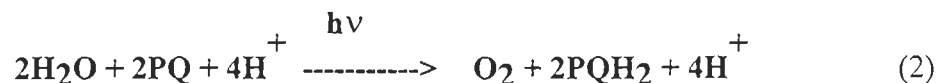
II.2. Aspect fonctionnel

II.2.1. Processus de transfert d'électrons

L'activité la plus connue se déroulant dans la membrane photosynthétique est le transfert d'électrons. D'une façon sommaire, les électrons sont transférés linéairement du PSII vers la face stromale du PSI pour réduire les molécules de NADP^+ en NADPH [Miller et Brudvig (1991)]. Cela se réalise via le "pool" de plastoquinone, le complexe de cytochrome b_6f , la plastocyanine et le PSI. Le schéma en Z de Hill représentant cet événement est présenté à la **figure 9A**. Une autre partie de ce processus, qualifié de transfert d'électrons cyclique, contribue à réduire les molécules de plastoquinones par l'intermédiaire du complexe de cytochrome b_6f . En partant de cette conception globale de ce processus, nous allons décrire en détail le transfert d'électrons dans le PSII.

II.2.2. Transfert d'électrons dans le photosystème II

Dans la membrane photosynthétique, le PSII catalyse l'oxydation de l'eau dépendante de la lumière et la réduction de la plastoquinone en plastoquinol [Eaton-Rye et Murata (1989), Miller et Brudvig (1991), Briggs (1989)]. Une molécule d'oxygène est ainsi relâchée comme produit d'oxydation de l'eau. La réaction générale illustrant le phénomène est donnée par l'équation



Globalement, le processus de transfert d'électrons commence avec l'absorption de la lumière par les complexes pigment-protéines des antennes collectrices de photons (LHCII) situées à la périphérie du PSII. Cette énergie absorbée par le complexe d'antennes est

transférée au PSII, et ultimement à une paire spéciale de Chl *a* appelée P680 [Govindjee et Coleman (1990)]. L'énergie des photons excite la P680 à un niveau singulet supérieur. Environ 3 psec après sa formation, l'état singulet excité de P680 réduit une Phé voisine, formant ainsi $P680^{+}$ et $Phé^{-}$ [Wasielewski et coll. (1989)]. La stabilisation de ces espèces contre une recombinaison de charges est accomplie grâce à une oxydation rapide (250-550 psec) de la $Phé^{-}$ par la plastoquinone Q_A [Schatz et coll. (1987), Eckert et coll. (1988), Trissl et coll. (1989)]. Cette oxydation de la $Phé^{-}$ va de concert avec une réduction rapide (40-280 nsec) de $P680^{+}$ par une tyrosine rédox-active appelée TyrZ, ou Tyr-161, du polypeptide D1 [Gerken et coll. (1988), Hoganson et Babcock (1988), Debus (1992)]. La recombinaison de charges entre Q_A^{-} et $TyrZ^{+}$ est empêchée par le transfert d'électrons (100-200 μ sec) de Q_A^{-} vers Q_B formant Q_B^{-} [Robinson et Crofts (1983), Debus (1992)]. Le complexe d'oxydation de l'eau qui contient les quatre ions de Mn réduit la $TyrZ^{+}$ à l'intérieur d'un temps de 20 à 1300 μ sec [Debus (1992), Delrieu (1995)]. Avant que la recombinaison de charges ait lieu entre Q_B^{-} et le complexe d'oxydation de l'eau, une autre séparation de charges génère $TyrZ^{+}$ et Q_A^{-} pour une seconde fois. Le complexe d'oxydation de l'eau réduit ensuite $TyrZ^{+}$. De cette façon, on assiste à une accumulation d'un second équivalent d'oxydation tandis que Q_A^{-} réduit Q_B^{-} . Le transfert d'électron de Q_A^{-} vers Q_B^{-} est accompagné de protonation résultant en la formation de Q_BH_2 qui quitte le site de Q_B [Hansson et Wydrzynski (1990), Debus (1992)]. Il a été observé par Rutherford et Zimmermann (1984) et Hallahan et coll. (1991) que les deux ions Q_A^{-} et Q_B^{-} interagissent magnétiquement avec un ion Fe^{2+} non-hème voisin. Le rôle de cet ion Fe^{2+} n'est pas encore compris. Une seconde tyrosine rédox-active est aussi présente dans la protéine D2 du centre réactionnel du PSII. Elle est connue sous la dénomination de TyrD [Miller et Brudvig (1991), Debus (1992)]. Cependant sa participation réelle dans le processus de transfert d'électrons reste à clarifier.

L'oxydation de l'eau requiert que le complexe de manganèse accumule au total quatre équivalents d'oxydation [Govindjee et Coleman (1990), Debus (1992), Hansson Wydrzynski (1990)]. Alors, le cycle du complexe d'oxydation de l'eau passe par une série de cinq états d'oxydation nommés S et désignés par S_n , où n représente le nombre d'équivalents d'oxydation. Le mécanisme guidant les transitions des états S (S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4) est l'oxydation du Mn par TyrZ^+ . Des mesures des cinétiques dans l'ultraviolet ont permis à Dekker et coll. (1984a,b) et Van Gorkom et coll. (1982) de déterminer la durée des différentes transitions entre les états S. Elle est de 30, 110, 350 et 1300 μsec pour les transitions S_0 - S_1 , S_1 - S_2 , S_2 - S_3 et S_3 -(S_4)- S_0 respectivement. S_4 est vu comme un état transitoire qui retourne spontanément à S_0 après libération de l'oxygène moléculaire. L'idée de l'oxydation de deux molécules d'eau durant les transitions des états S est à présent universellement acceptée. Les détails sur l'oxydation de l'eau au niveau du complexe de Mn et les états de transition S sont présentés dans les travaux de Debus (1992), Pauly et Witt (1992) et Kretschmann et Witt (1993). Le schéma illustrant le processus de transfert d'électrons spécifiquement dans le complexe de PSII est présenté à la **figure 9B**.

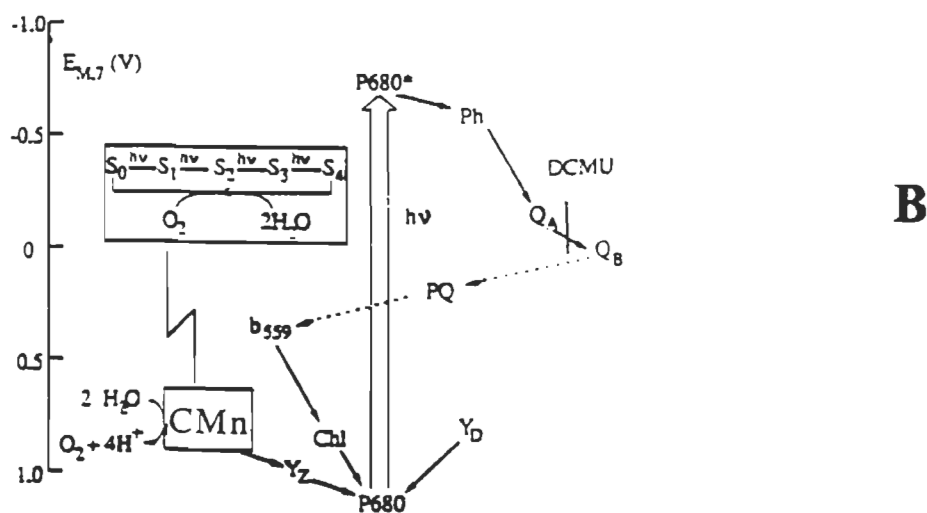
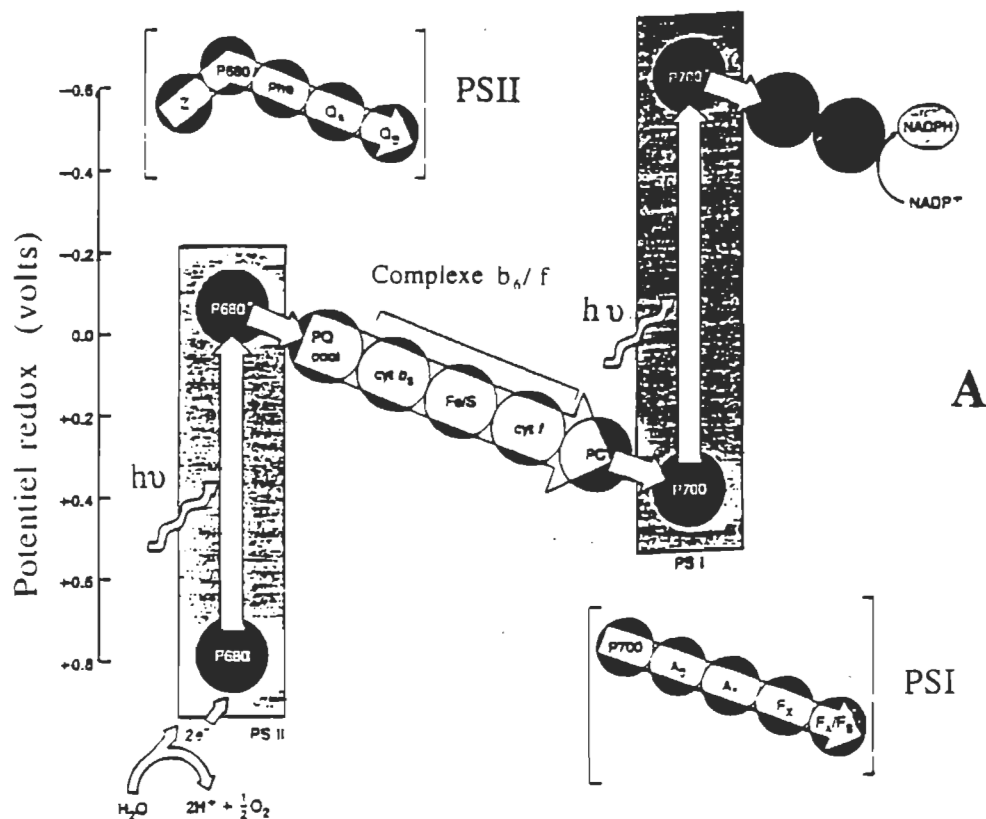


Figure 9. Schémas du processus de transfert d'électrons: A) dans la membrane des thylacoïdes [Wolfe (1993)], B) dans le PSII [Miller et Brudvig (1991)].

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Brièvement, la méthodologie suivie dans ce travail consiste d'abord dans l'obtention des fragments membranaires de PSII à partir des feuilles d'orge. Ensuite, les échantillons de PSII sont irradiés avec de la lumière UV. Et finalement, nous procédons à la caractérisation des effets de la radiation UV sur la structure et l'activité des complexes de PSII, à l'aide de méthodes spectroscopiques, d'électrophorèse des protéines, et de transfert d'électrons.

III.1. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans la préparation des solutions d'isolement et de conservation des fragments membranaires de PSII sont l'acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique (MES), le chlorure de calcium (CaCl_2), le chlorure de magnésium (MgCl_2), le chlorure de sodium (NaCl), le bis[2-hydroxyéthyl]imino-tris[hydroxyméthyl]-méthane ou bis-tris (BT), le n-dodécyl β -D-maltoside. Ces produits sont obtenus de SIGMA Chemical Company (St-Louis, MO, USA). Les accepteurs artificiels d'électrons utilisés dans l'analyse de l'intégrité fonctionnelle des fragments membranaires de PSII sont le 2,6-dichloro-p-benzoquinone (DCBQ) et le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCIP). Ils proviennent aussi de SIGMA Chemical Company. De cette compagnie, nous avons aussi obtenu les substances chimiques suivantes: acrylamide, bis-acrylamide, Trizma (tris[hydroxyméthyl]-aminométhane), Temed, sodium dodécylsulfate (SDS), mercaptoéthanol et persulfate d'ammonium. Elles servent dans les études électrophorétiques. Le standard protéinique qui permet d'identifier les polypeptides du PSII dans le gel d'électrophorèse est obtenu de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA).

L'oxyde de deutérium (D_2O , 99.99 atome % D) provient de MSD Isotopes (Division de Merck Frost Canada Inc., Montréal, Québec).

III.2. Culture des plantules d'orge

Le photosystème II, matériel principal utilisé dans cette étude, est extrait des feuilles d'orge. Les graines d'orge et la vermiculite dans laquelle elles ont été semées proviennent de la Floriculture Gautier, Trois-Rivières, Québec, Canada. Les graines d'orge ont été semées dans un bac à fond perforé, entre deux couches de vermiculite. Le tout est arrosé et placé dans une chambre de croissance aménagée dans notre laboratoire (température ambiante, lumière blanche). Le semis est alors soumis à un éclairage quotidien (14 heures) avec lumière blanche d'une intensité incidente d'environ 12 W.m^{-2} . Au cours de leur croissance, les plantules sont arrosées une fois par jour jusqu'à sept à huit jours après l'ensemencement.

III.3. Méthode d'isolement du PSII

Avant la récolte des feuilles, les plantules d'orge ont été placées dans l'obscurité pendant 5 à 7 heures afin de réduire substantiellement la teneur en amidon dans les chloroplastes. Ensuite, les feuilles sont récoltées pour en extraire les fragments membranaires de PS II, et ce, selon les méthodes Berthold et coll. (1981) et de van Leeuwen et coll. (1991) auxquelles nous avons apporté quelques petites modifications.

Les feuilles d'orge auxquelles nous avons ajouté la solution tampon d'isolement sont broyées dans un mélangeur. Cette solution d'isolement est composée de MES (20 mM, pH 6.0), NaCl (15 mM), $CaCl_2$ (5 mM) et sucrose (400 mM). Après filtration sur du tissu en coton, l'homogénat vert est centrifugé durant 2 minutes à $10\,000 \times g$. Ensuite le culot de chloroplastes est resuspendu dans la solution d'isolement. Le tout est agité doucement sur

de la glace, dans une chambre noire. À ce stade, nous procédons au dosage de la chlorophylle en ajoutant 12.5 μL de la suspension verte dans 5 mL d'un mélange composé d'acétone (80 %) et d'eau distillée (20 %). La concentration de PSII dans la solution, [PSII], en $\text{mg Chl} \cdot \text{mL}^{-1}$ est obtenue à l'aide de l'équation [Holden (1976)]

$$[\text{PSII}] = (8.02A_{663} + 20.2A_{645}) \times 0.4 \quad (3)$$

où A_{663} et A_{645} représentent respectivement les absorbances à 663 et 645 nm, et 0.4 est un facteur de dilution. Cette valeur de [PSII] permet de déterminer le volume de détergent (TX-100) qu'il faut utiliser.

Au fur et à mesure que l'agitation de la suspension continue, nous y ajoutons une solution de triton X-100 (TX-100) jusqu'à une concentration finale de 25 mg de détergent par mg de Chl. La suspension est centrifugée 15 minutes après l'ajout de la solution de TX-100 pour une durée de 25 minutes à 40 000 \times g. Le culot est resuspendu une autre fois dans le tampon d'isolement. Cette opération est suivie d'une autre centrifugation de 5 minutes à 2 000 \times g afin d'éliminer l'excès d'amidon. Ensuite, l'homogénat est centrifugé pendant 25 minutes à 40 000 \times g. Le culot (fragments membranaires de PSII) est récupéré dans un tampon de conservation (BTS400) contenant Bis-Tris (20 mM, pH = 6.5), MgCl_2 (20 mM), CaCl_2 (5 mM), MgSO_4 (10 mM), sucrose (400 mM) et n-dodécyl β -D-maltoside [0.03%, (m/v)]. Le PSII ainsi obtenu est utilisé soit directement pour la suite de l'expérience ou conservé au congélateur à 138 K. Les centrifugations sont faites à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Dupont Instruments Inc., Canada.

Nous signalons que contrairement à van Leeuwen et coll. (1991), Berthold et coll. (1981) ont obtenu des fragments membranaires de PSII à partir des membranes de

thylacoïdes. Nous prendrons ces conditions expérimentales en considération lors de la discussion des résultats présentés au **Chapitre IV**.

III.4. Méthodes de caractérisation des effets de la radiation UV

La méthodologie décrite dans cette section vise à mettre en évidence les effets caractéristiques de la radiation UV sur l'activité et les composantes moléculaires majeures des fragments membranaires du PSII. Ainsi nous faisons toutes les mesures simultanément sur des échantillons irradiés et non irradiés aux UV. Les échantillons non exposés au rayonnement UV servent de contrôle.

III.4.1. Irradiation UV des échantillons de PSII

L'étude des effets du rayonnement UV sur les complexes PSII a nécessité la conception d'un dispositif d'irradiation avec de la lumière UV dont le schéma est présenté à la **figure 10**. Il est composé d'une source de tension alimentant une lampe au Xénon. La lumière blanche émise par cette lampe passe à travers un tube métallique dans lequel circule continuellement de l'eau froide. Cette eau agit comme un filtre de chaleur. La circulation d'eau froide permet de protéger le filtre d'interférence contre une température excessive. Ensuite cette lumière arrive au niveau d'un filtre d'interférence qui sélectionne le faisceau monochromatique ultraviolet désiré. Ce faisceau illumine l'échantillon de PSII. Chaque filtre d'interférence possède une bande passante de 5 nm de largeur. Les filtres d'interférence proviennent de la compagnie Oriel (Stratford, CT). La chambre à échantillons est maintenue à environ 275 K grâce à un bain à température constante (bain thermostaté) MGU LAUDA RC3, Model S-1 (Germany).

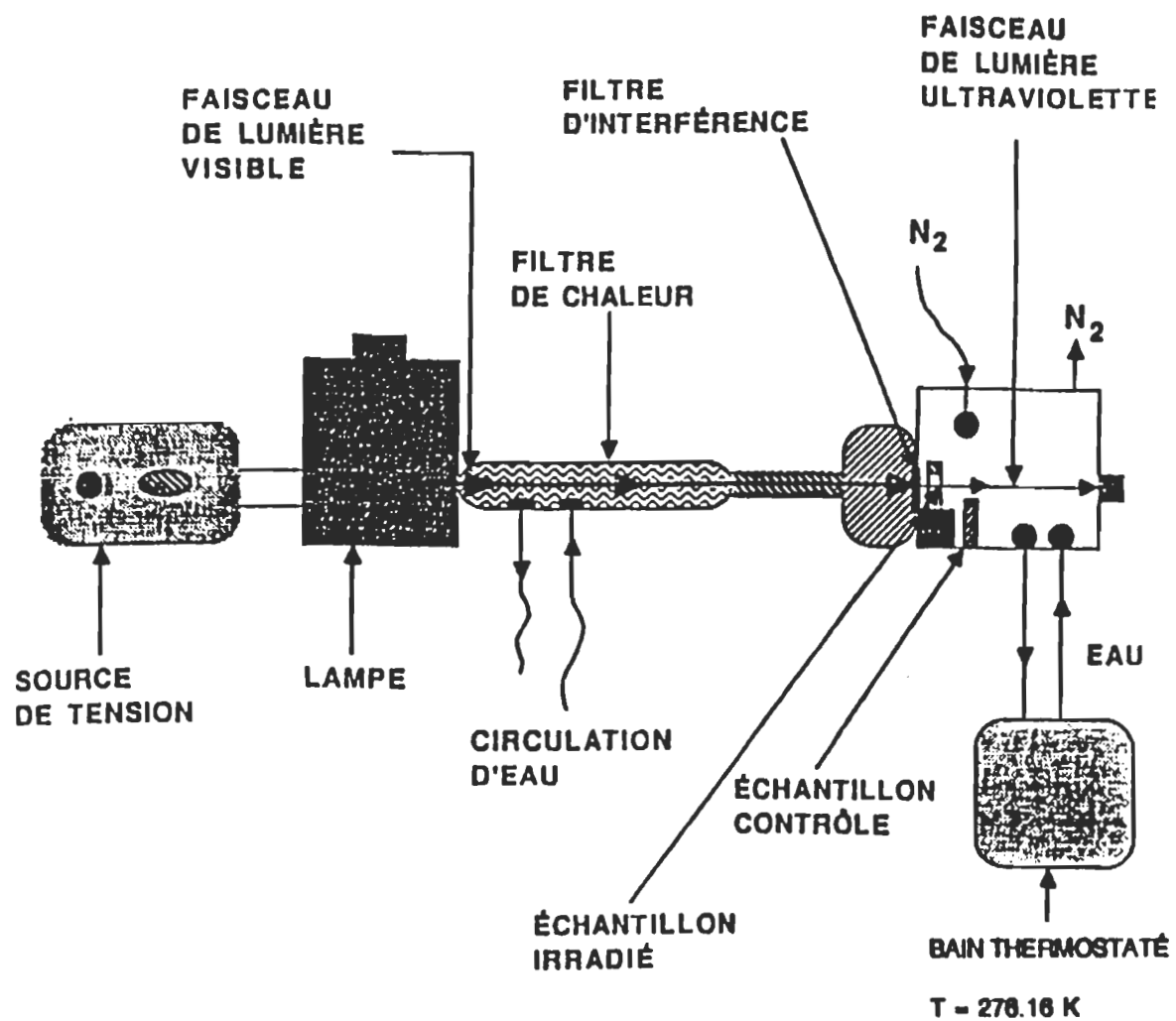


Figure 10. Schéma du dispositif d'irradiation des échantillons avec de la lumière UV.

III.4.2. Mesure de l'activité de dégagement d'oxygène

Comme il a été discuté au **Chapitre II**, le PSII produit de l'oxygène moléculaire en dégradant deux molécules d'eau à la fois au cours du processus de photosynthèse (voir **section II.2.2**). Alors, afin de s'assurer de l'intégrité fonctionnelle des particules de PSII isolé, nous procédons à la quantification de cet oxygène produit à l'aide d'une méthode polarographique. Cette méthode nécessite l'utilisation d'une électrode combinée de type Clark (Oxygen Electrode Unit) de la compagnie Hansatech D.W. (King's Lynn, Norfolk, England). Elle est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent. Une membrane en papier fin de type cigarette (Rizla LTD, Norfolk, England) imbibée d'une solution saturée de KCl permet de relier la cathode et l'anode. Ainsi, ce système d'électrodes permet d'enregistrer une réponse instantanée, caractéristique des réactions photosynthétiques [Delieu et Walker (1972)]. Le système est couplé à une cellule en verre de silicate de bore ou chambre à réaction. L'étanchéité entre les deux modules est assurée par une membrane de Téflon de 12.5 μm d'épaisseur. Soulignons que la membrane de Téflon n'a pas d'incidence néfaste sur la sensibilité de l'électrode de Clark. La calibration des niveaux 0 et 100 % d'oxygène du système d'enregistrement est effectuée respectivement avec de l'hydrosulfite de sodium et de l'eau distillée bien agitée.

Nous ajoutons des quantités précises de solutions de PSII (traité ou non avec de la radiation UV) et de DCBQ ou DCIP (700 μmoles ou 4.2×10^{20} molécules) dans la chambre à réaction maintenue à 294 K grâce à un bain thermostaté (Haake, Berlin, Germany). Après 3 minutes d'incubation, nous illuminons le mélange avec une lumière visible saturante ($375 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$) émise par une source de type "fiber-Lite" (High Intensity Illuminator series 180, Dolan-Jenner Industries Inc., Minebea CO LTD, Thailand). L'oxygène produit par les fragments membranaires de PSII est réduit en peroxyde d'hydrogène au niveau de la cathode. Le courant ainsi généré est directement proportionnel à la quantité d'oxygène libéré. Les détails de la réaction aux électrodes sont présentés dans

le travail de Delieu et Walker (1972). Le signal électrique traduisant le dégagement d'oxygène est présenté à la **figure 11**.

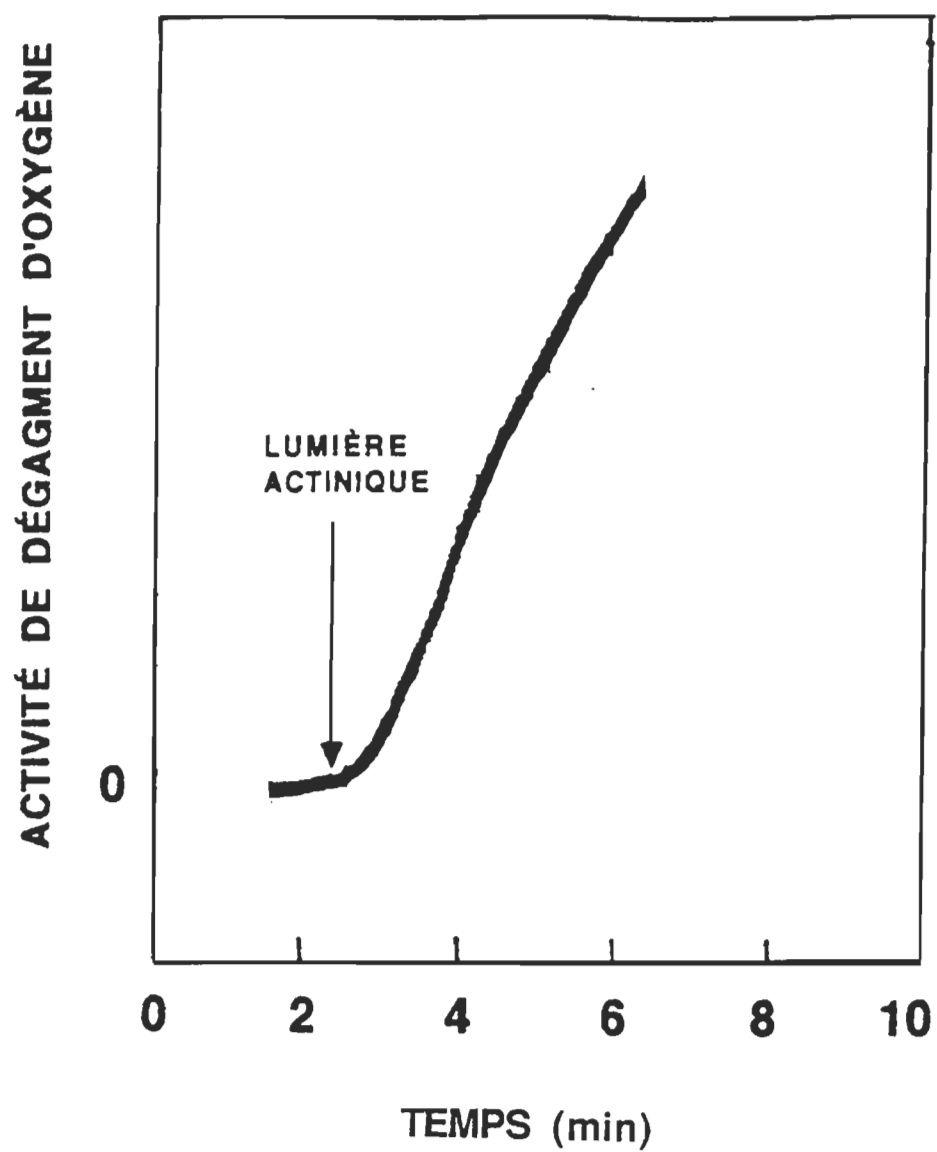


Figure 11. Mesure typique de l'activité de dégagement d'oxygène (ADO) des particules de PSII incubées dans la solution BTS400.

III.4.3. Mesure du transfert d'électrons: réduction du DCIP

Les échantillons pour les mesures de réduction de DCIP et de dégagement d'oxygène sont préparés de manière similaire. Une fois l'irradiation avec de la lumière UV terminée, nous ajoutons aux échantillons irradié et contrôle 700 μ moles de DCIP. L'homogénéité de ces derniers est assurée par une agitation vigoureuse. Ensuite, nous laissons les échantillons au repos afin d'éliminer toutes les bulles d'air. Nous mesurons l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 601 (Milton Roy Company, USA). Puis, ces mêmes échantillons sont soumis pendant une minute à la radiation visible actinique. Une fois cette opération achevée, nous mesurons à nouveau l'absorbance. La réduction des molécules de DCIP se caractérise par une baisse linéaire de la valeur d'absorbance de l'échantillon illuminé par rapport à celui qui n'est pas photo-oxydé pendant la période d'illumination qui est d'une minute. En d'autres mots, durant la période d'une minute d'illumination de l'échantillon avec la lumière actinique [$t=0$ min (début de l'éclairage), $t = 1$ min (arrêt de l'éclairage)] le signal caractérisant la photoréduction du DCIP subit une décroissance linéaire. Finalement, le calcul de la différence d'absorbance permet d'obtenir la quantité de DCIP selon la loi classique de Lambert-Beer dont l'expression se présente de la façon suivante [Chavanne et coll. (1987)]:

$$C = A / \varepsilon l \quad (4)$$

où A, ε , l et C représentent respectivement l'absorbance, l'absorptivité, la longueur du parcours optique (cm) et la concentration ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Le coefficient d'extinction molaire utilisé pour le DCIP est de $18.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Miyao et Inoue (1991)] car, comme ces auteurs, nos expériences sont faites à pH 6.5 et à une température variant entre 296 et 298 K.

III.4.4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Afin de nous assurer de son intégrité structurale, nous caractérisons la composition polypeptidique du complexe de PSII en utilisant la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis"). Cela consiste en une séparation différentielle des polypeptides du PSII selon la masse moléculaire dans un gel à deux niveaux de compositions différentes. La partie supérieure d'environ 1.50 cm de largeur constitue le gel d'entassement, tandis que la portion inférieure (plus grande) est appelée gel de résolution. Le gel d'entassement est composé d'acrylamide (30 %), bisacrylamide (0.80 %), SDS (10 %), TEMED (20 μL), sulfate (10 %) d'ammonium, Tris (0.05 M, pH 6.8) et 0.03 M de H_2SO_4 . Quant au gel de résolution, il est obtenu avec la technique de gradient de sucrose. La solution la plus diluée est préparée avec 11.5 ml d'un mélange acrylamide (30 %)-bisacrylamide (0.80 %), 9.00 ml de tampon [Tris (0.40 M), pH 9.2; HCl (0.03 M)], 3.80 ml de sucrose (60 %), 0.45 ml de SDS (10 %), 20 μL de TEMED, 150 μL persulfate d'ammonium (10 %) et 20.35 mL de H_2O . La seconde solution est préparée à partir de 22.5 mL du mélange d'acrylamide (30 %)-bisacrylamide (0.80 %), 9.00 mL de tampon [Tris (0.40 M), pH 9.2; HCl (0.03 M)], 12.90 mL de sucrose (60 %), 450 μL de SDS (10 %), 150 μL de persulfate d'ammonium (10 %) et 10 μL de TEMED.

La méthode utilisée est celle développée par Chua en 1980. Elle consiste à dégrader en premier les particules de PSII ($150 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$) dans une solution tampon constituée de SDS (1.5 %), mercaptoéthanol (5 %), glycérol (28 %) et Tris (5 mM, pH 6.8). Soulignons que ces solutions d'environ $150 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ de PSII natif et photo-oxydé sont obtenues à partir des échantillons de $20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ qui ont été concentrés par dialyse. Un volume de 6 μL de standard protéinique est traité de manière similaire. Après une heure d'incubation à la température de la pièce, les solutions de PSII photo-oxydé et non irradié ainsi que celle du standard protéinique sont déposées dans les puits du gel d'entassement. Ensuite, nous

soumettons le gel à un champ électrique créé par un générateur de courant Ortec, Modèle 4100 Pulsed Constant Power Supply, lequel fournit un courant d'une intensité de 75 mA. À la fin de la migration, nous colorons le gel de résolution avec une solution contenant du Bleu de Coomassie Brillant R-250 (0.10 %), de l'acide acétique (7 %) et du méthanol (20 %). Il est soumis à l'agitation douce et continue pour une durée approximative de 24 heures. Ensuite, de la même façon, le gel est décoloré avec un mélange d'acide acétique glacial (7 %), de méthanol (20 %) et de glycérol (3 %). Finalement, l'identification des protéines se fait à l'aide d'un densitomètre LKB 2222-020 Ultrascan XL Enhanced Laser Densitometer (Bromma, Sweden). Un densitogramme typique d'un gel d'électrophorèse de particules de PSII natif est présenté à la **figure 12**.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE (Ph.D)**

**PAR
JACOB A. SÉGUI
DIRECTEUR: PROFESSEUR MARIO J. FRAGATA (D.Sc.)**

**EFFETS DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET
SUR LE FONCTIONNEMENT ET LA STRUCTURE
DU PHOTOSYSTÈME II DES CHLOROPLASTES D'ORGE**

MAI 1999

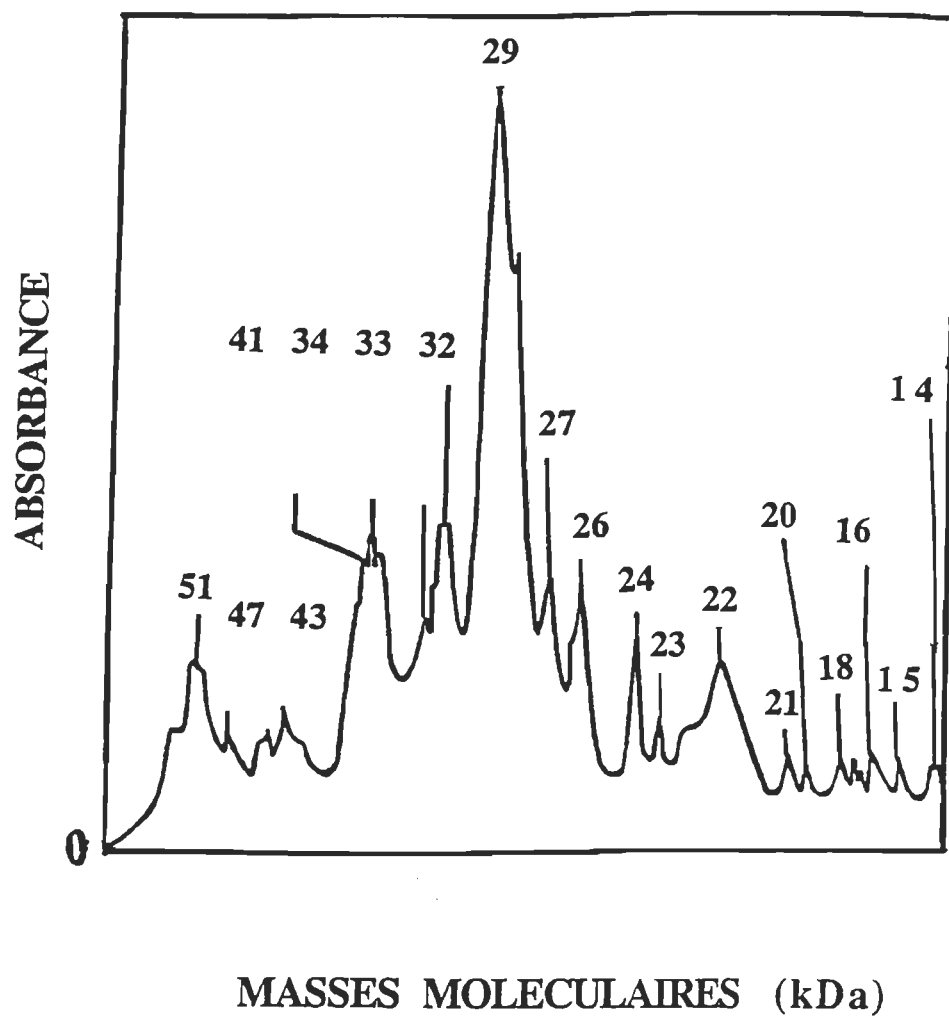


Figure 12. Densitogramme d'un gel d'électrophorèse de PSII natif. Les masses (kDa) moléculaires sont indiquées sur les pics d'absorption des polypeptides.

III.4.5. Méthodes spectroscopiques

III.4.5.1. Spectroscopie UV-visible

Nous préparons une solution avec le tampon de conservation (BTS400) pour une concentration en fragments membranaires de PSII de $20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$. L'utilisation du tampon BTS400 comme milieu d'incubation est nécessaire parce qu'il contient du n-dodécyl β -D-maltoside. Dans nos conditions expérimentales, la présence de ce détergent permet d'éviter la précipitation des particules de PSII lors de l'irradiation avec la lumière UV. Le mécanisme par lequel la présence du n-dodécyl β -D-maltoside empêche la précipitation des particules de PSII lors de l'exposition aux radiations UV n'est pas jusqu'à présent clairement démontré. Néanmoins, Searle et coll. (1990) ont rapporté qu'en présence de ce détergent les particules du centre réactionnel du PSII (D1/D2/cyt_{b559}) sont stables dans l'obscurité ainsi qu'en présence de lumière à des températures cryogéniques (basses températures). Par ailleurs Chapman et coll. (1991) affirment que l'utilisation du n-dodécyl β -D-maltoside dans la phase finale d'isolation du PSII protège les particules du dommage thermique.

Dans deux cellules identiques en quartz (cellules de fluorescence) de 1 cm de parcours optique, nous ajoutons cette solution de PSII à volume égal. Après avoir recouvert complètement le contrôle de papier en aluminium, les cellules sont par la suite placées dans la chambre noire à échantillons. L'échantillon non protégé est irradié avec de la lumière UV de façon continue pour une durée préalablement établie. Finalement, nous mesurons le spectre d'absorption de chaque échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre à réseau de diodes (Diode array spectrophotometer 8452A, Milton Roy Company, USA). L'acquisition et le traitement des spectres sont faits à l'aide d'un programme d'informatique élaboré par M. André Paquet et le Professeur Pierre Blanchet du Département de Chimie-Biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

III.4.5.2. Spectroscopie infrarouge

Dans cette partie du travail, l'opération la plus délicate s'avère la préparation des échantillons, c'est-à-dire, des films partiellement déséchés de fragments membranaires de PSII. Nous commençons d'abord par laver le PSII avec de l'eau deutérée (D_2O) afin de minimiser l'absorption des molécules de H_2O lors de l'enregistrement des spectres. Pour ce faire, les fragments membranaires de PSII conservés jusque là dans le tampon BTS400 sont centrifugés 3 fois (7 minutes par centrifugation) à $40\,000 \times g$ en présence de D_2O . Ensuite, nous déposons des échantillons de PSII natif sur deux fenêtres identiques de fluorure de baryum (BaF_2). Ces fenêtres sont alors disposées sur un vase de Pétri qui repose à son tour sur un fond de glace recouvert de papier buvard. Le système permet de garder les films de PSII dans l'obscurité et de maintenir leur température au voisinage de 273 K. Le séchage des échantillons est assuré à l'aide d'un courant d'azote gazeux (N_2) pendant 90 à 120 minutes. Le schéma du système de préparation des films est montré à la **figure 13**. Comme précédemment, l'un des films ainsi obtenus est traité à la radiation UV de façon continue tandis l'autre (*contrôle*) est gardé à l'obscurité dans la même chambre à échantillons.

Soulignons qu'avant l'exposition à la lumière UV, nous nous assurons de l'intégrité fonctionnelle des complexes de PSII en vérifiant l'activité de dégagement d'oxygène des films déposés directement sur le plateau Pétri. Pour ce faire, nous récupérons complètement tous ces films de PSII dans un volume minimal de BTS400. Après le dosage de la Chl, nous mesurons l'activité de dégagement d'oxygène de ces particules. Si cette nouvelle activité de dégagement d'oxygène est inférieure de plus de $2 \mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ à celle obtenue avant le séchage, les films de PSII déposés sur les fenêtres de BaF_2 sont pas utilisés pour les mesures des spectres FTIR. Nous avons adopté ce critère afin de minimiser les erreurs d'interprétation à cause des faibles intensités de lumière UV utilisées dans ce travail.

Les mesures des spectres FTIR ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Bomem DA 3.02 infrared Fourier (Bomem Inc, Vanier, Québec, Canada). Il est muni d'un détecteur Mercure-Cadmium-Tellure (MCT). Ce spectrophotomètre FTIR est caractérisé par un pouvoir de résolution de 2 cm^{-1} , une vitesse de balayage de $0.5\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ et des filtres passe-bas et passe-haut respectivement de 20.0 kHz et 2.0 Hz. Le schéma détaillé de l'appareillage et son principe de fonctionnement sont donnés dans Pachler et coll. (1988) et Nénonéné (1992). Les fenêtres de BaF_2 sont obtenues de la compagnie Harrick Scientific (Ossining, NY, USA). Elles possèdent 25 mm de diamètre, 2 mm d'épaisseur et 1.45 d'indice de réfraction. Leur limite inférieure d'efficacité est de 1000 cm^{-1} .

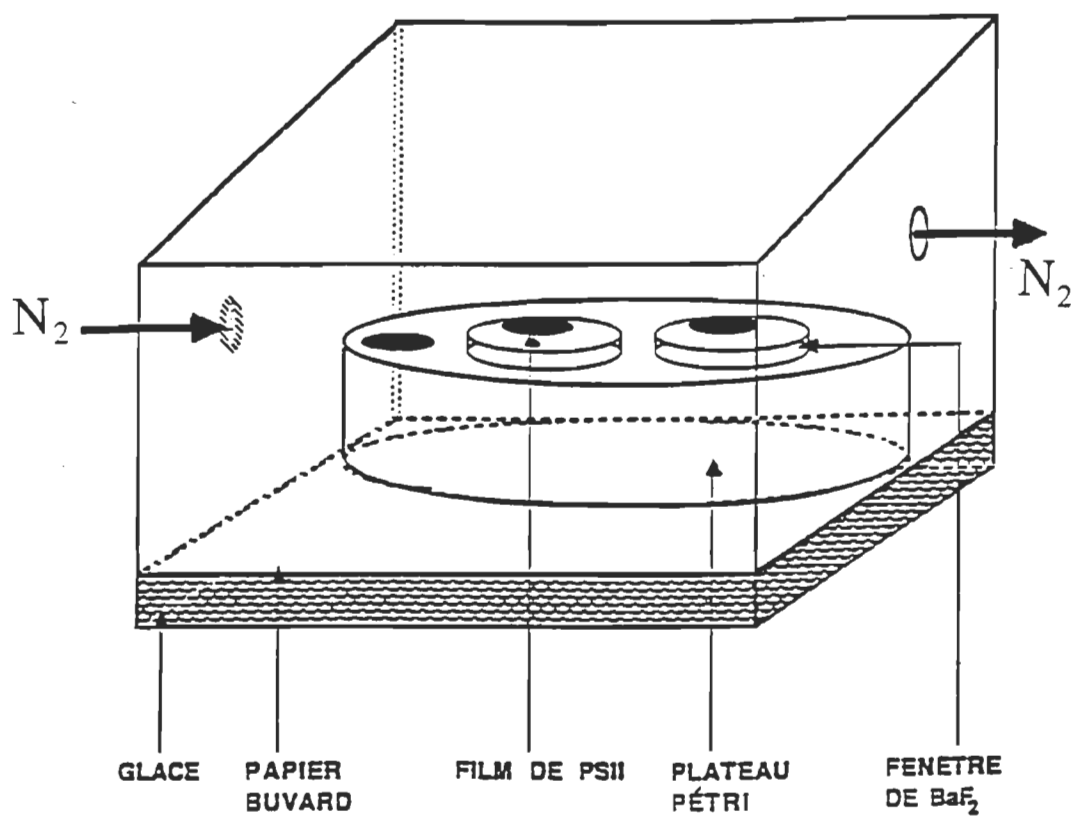


Figure 13. Schéma du dispositif de préparation des films de PSII utilisés pour la mesure des spectres infrarouges.

CHAPITRE IV

EFFETS DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET

SUR LE PHOTOSYSTÈME II:

ASPECT FONCTIONNEL

IV.1. Résultats

Comme nous l'avons vu en haut, le fonctionnement du PSII conditionne la réalisation du processus (primaire) de photosynthèse. Ainsi, plusieurs paramètres comme la fluorescence variable et le changement d'absorption induit par des éclairs [Bornman et coll. (1984), Bornman (1986)] ont été utilisés pour examiner son rôle dans la membrane photosynthétique et étudier conséquemment l'impact des radiations UV sur le développement des plantes supérieures. En ce qui concerne ce travail, nous avons évalué les effets de la radiation UV sur l'intégrité fonctionnelle du PSII en mesurant les activités de dégagement d'oxygène (ADO) et de réduction des molécules de DCIP.

IV.1.1. Efficacité relative du DCBQ et du DCIP dans le dégagement d'oxygène du PSII non irradié avec de la lumière UV

Avant d'entreprendre l'étude proprement dite des effets de la radiation UV sur le fonctionnement du PSII, nous avons voulu évaluer l'efficacité de deux accepteurs exogènes d'électrons, à savoir le DCBQ et le DCIP. Les mesures de l'activité de dégagement d'oxygène sont réalisées avec une concentration de fragments membranaires de PSII de 20 $\mu\text{g Chl.ml}^{-1}$ (environ 3.0×10^{14} molécules de PSII par mL de solution). La teneur en accepteur d'électrons (DCBQ ou DCIP) est de 700 μmoles (environ 4.2×10^{20} molécules de

chaque accepteur par mL de solution). Les échantillons de fragments membranaires de PSII servant à la cueillette des données sont préparés à une température d'environ 273 K.

Lorsque des échantillons contrôle de PSII sont irradiés avec de la lumière visible actinique de 375 W.m^{-2} en présence de DCBQ, nous obtenons des activités de dégagement d'oxygène (ADO) de l'ordre de $350\text{-}545 \mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. Par contre, dans des conditions expérimentales identiques, l'utilisation du DCIP en remplacement du DCBQ conduit à une activité de $170\text{-}230 \text{ O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. Nos résultats montrent que l'ADO des particules de PSII dépend du type d'accepteur exogène d'électrons utilisé. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité de dégagement d'oxygène enregistrée en présence de DCBQ est un peu plus du double de celle obtenue avec l'emploi du DCIP. Ce rapport de 2.2 ± 0.2 tend à prouver que le DCBQ est un accepteur d'électrons plus efficace que le DCIP. De surcroît, la relation

$$[\text{O}_2]_{\text{DCBQ}} \sim 2.2 [\text{O}_2]_{\text{DCIP}} \quad (5)$$

est en accord avec l'idée d'une existence de deux mécanismes différents de transport d'électrons à la face stromale du PSII dans lesquels sont impliqués le DCIP et le DCBQ [Purcell et Carpentier (1993), Ikeuchi et Inoue (1986)]. Le DCIP accepte des électrons qui proviennent du "pool" de plastoquinones [Purcell et Carpentier (1993), Ikeuchi et Inoue (1986)]. Quant au DCBQ, il reçoit des électrons du site Q_B [Purcell et Carpentier (1993)]. Selon Ikeuchi et Inoue (1986), le DCBQ peut aussi accepter des électrons de Q_A . Un exemple de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène du PSII non irradié dans le temps est présenté à la **figure 14a**. Nous constatons une stabilité des échantillons contrôle pendant près de 50 min.

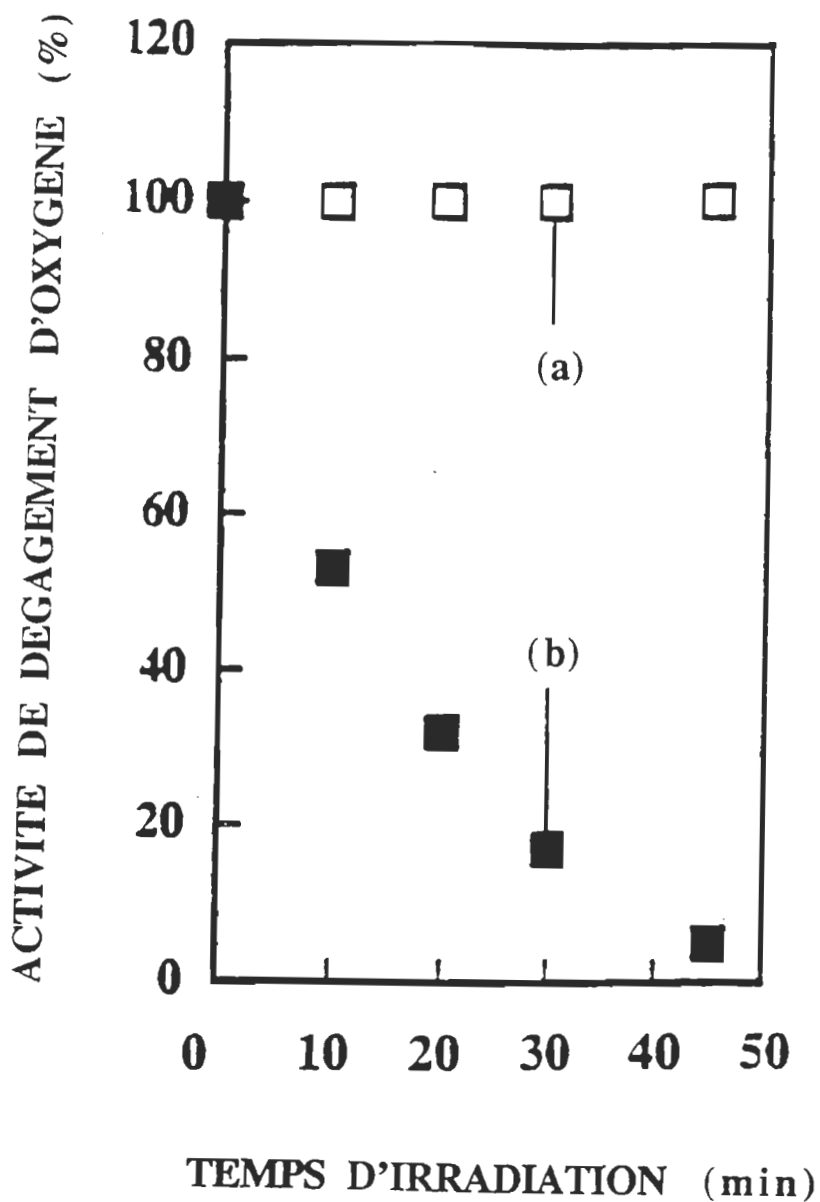


Figure 14. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière UV à 280 nm en présence de DCBQ: a) contrôle, b) irradié. Nombre de moles de DCBQ (n_{DCBQ}) = 700 μmoles , $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $I_{\text{inc}} = 2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

IV.1.2. Effet de la radiation UV sur les activités de dégagement d'oxygène et de réduction du DCIP

Outre le comportement du PSII non irradié, la **figure 14b** présente la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des échantillons de PSII à 280 nm. L'intensité incidente maximale de la radiation UV, la concentration de PSII et le nombre de moles de DCBQ (n_{DCBQ}) sont respectivement 2.0 W.m^{-2} , $20 \mu\text{g Chl.ml}^{-1}$ et $700 \mu\text{moles}$. L'ADO du PSII natif utilisé pour ces mesures est de $358.2 \pm 0.8 \mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. La **figure 14b** montre clairement une diminution de l'activité de dégagement d'oxygène au fur et à mesure que l'on prolonge la durée d'exposition des particules de PSII à la lumière UV (**280 nm**). Après 45 min d'irradiation continue avec de la lumière UV, l'activité de dégagement d'oxygène des particules de PSII est inhibée d'environ 95 %.

La **figure 15** montre l'activité de réduction du DCIP ($n_{\text{DCIP}} = 700 \mu\text{moles}$) en fonction du temps d'irradiation à 280 nm. Nous observons une chute de l'activité de transfert d'électrons de l'ordre de 73 % (**figure 15b**). Le comportement du contrôle demeure semblable à celui observé précédemment à la **figure 14a**. Cette baisse de l'activité de réduction du DCIP est en accord avec les observations de Renger et coll. (1989) ainsi que de Post et coll. (1996) quoique ces auteurs aient utilisé des intensités incidentes (I_{inc}) de lumière UV et des concentrations de fragments membranaires de PSII ($[\text{PSII}]$) plus élevées, c'est-à-dire, I_{inc} et $[\text{PSII}]$ de l'ordre respectif de $50\text{-}100 \text{ W.m}^{-2}$ et $100 \mu\text{g Chl.ml}^{-1}$.

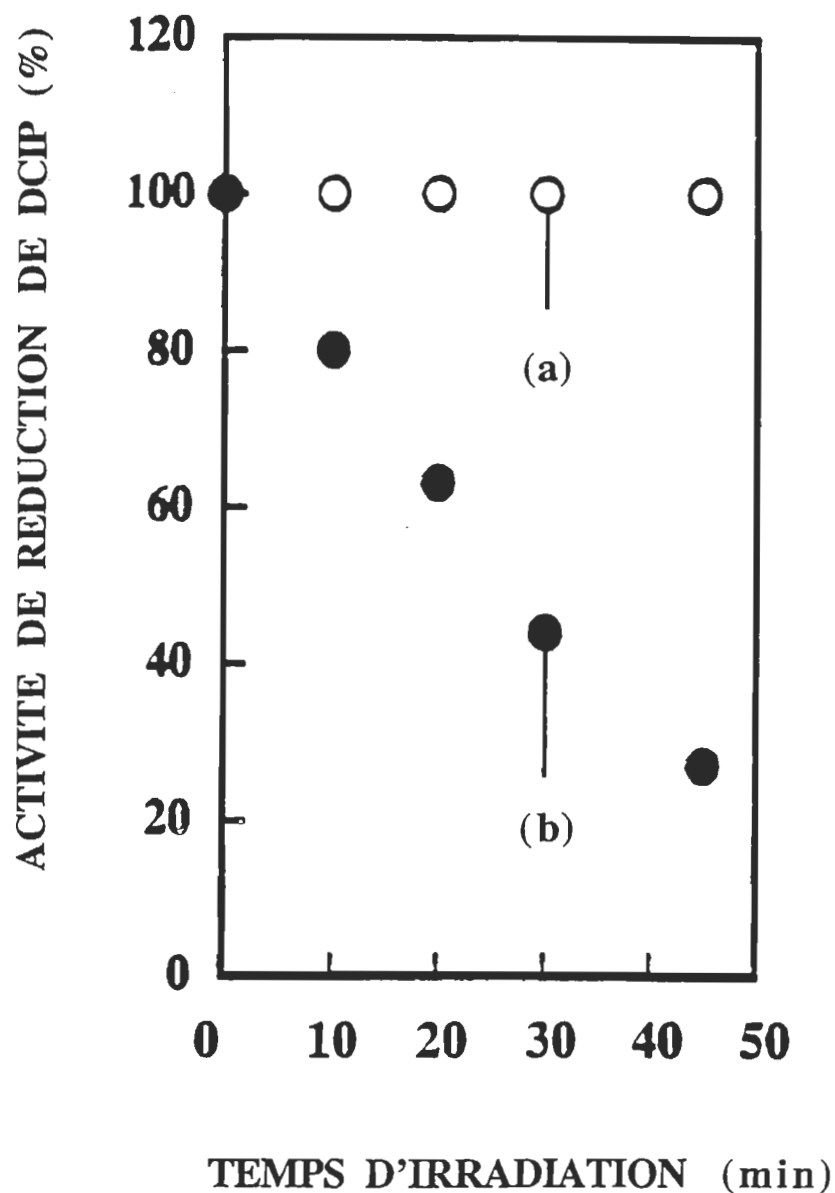


Figure 15. Graphes de la variation de l'activité de réduction de DCIP en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière UV à 280 nm: a) contrôle, b) irradié. Nombre de moles de DCIP (n_{DCIP}) = 700 μmoles , $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $I_{\text{inc}} = 2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

Les données expérimentales discutés en haut, obtenus dans des conditions identiques, indiquent un déclin de l'activité des particules de PSII d'environ 1.3 fois plus important lorsque le DCBQ est remplacé par le DCIP. Ce rapport de 1.3 correspond à une différence d'activité de transfert d'électrons d'environ 22 %. Les mêmes expériences ont été reprises aux longueurs d'onde de 204 et 226 nm (voir **figures 16-19**). À 204 nm, les diminutions des activités de dégagement d'oxygène et de réduction du DCIP induites par la radiation UV sont respectivement de l'ordre de 41 % et 29 %. L'ADO des fragments membranaires de PSII non irradié est de $545.4 \pm 1.1 \mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$. Concernant la longueur d'onde de 226 nm, les baisses respectives sont d'environ 32 et 24 %. Dans ce dernier cas, la baisse de l'activité été obtenue sur des particules de PSII natif dont l'ADO est de $534.7 \pm 1.0 \mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$. L'intensité de lumière incidente UV utilisée à 204 et 226 nm est de $0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

Les résultats discutés ci-dessus sont résumés dans le **tableau 2**. En ayant le même nombre de molécules de DCIP et DCBQ en excès par échantillon, nous pensons que toute saturation éventuelle de l'un ou l'autre des accepteurs d'électrons n'aura pas d'influence sur les différences d'activité notées en haut.

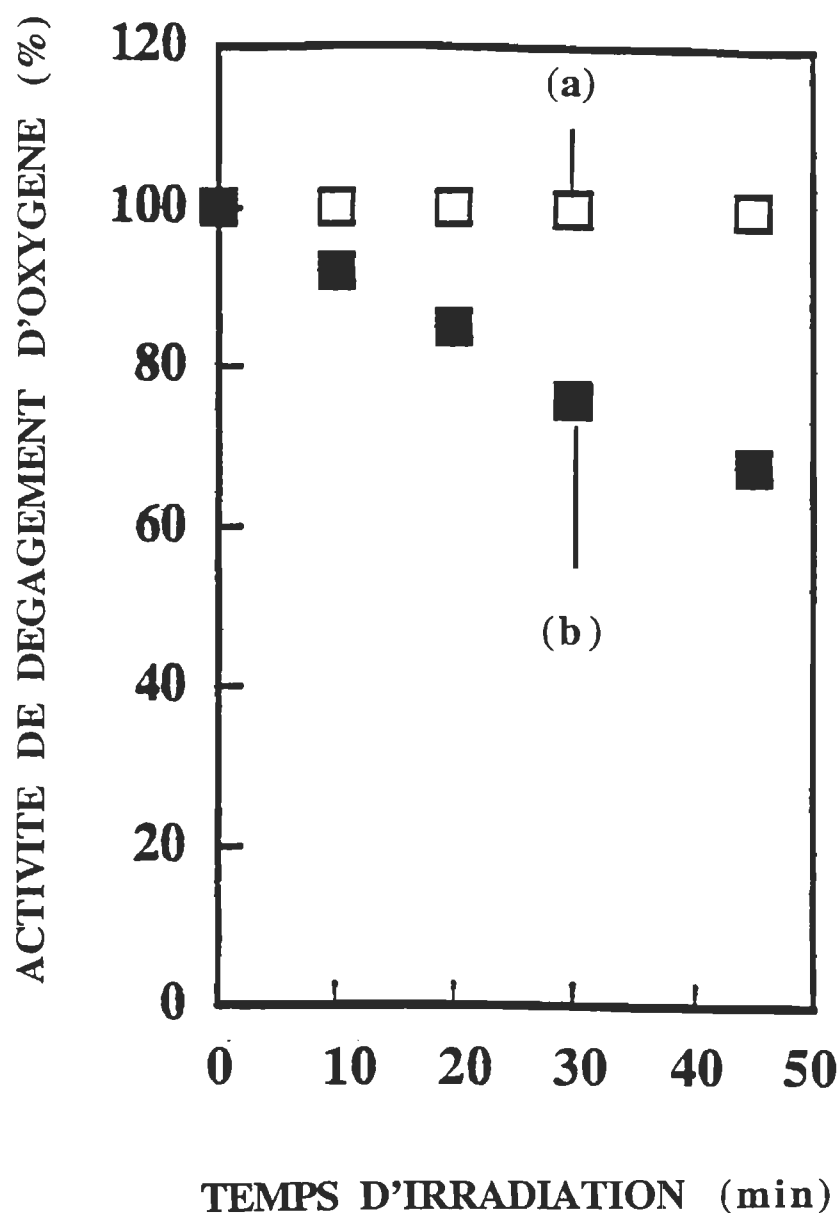


Figure 16. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière UV à 226 nm en présence de DCBQ: a) contrôle, b) irradié. Nombre de moles de DCBQ (n_{DCBQ}) = 700 μmoles , $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

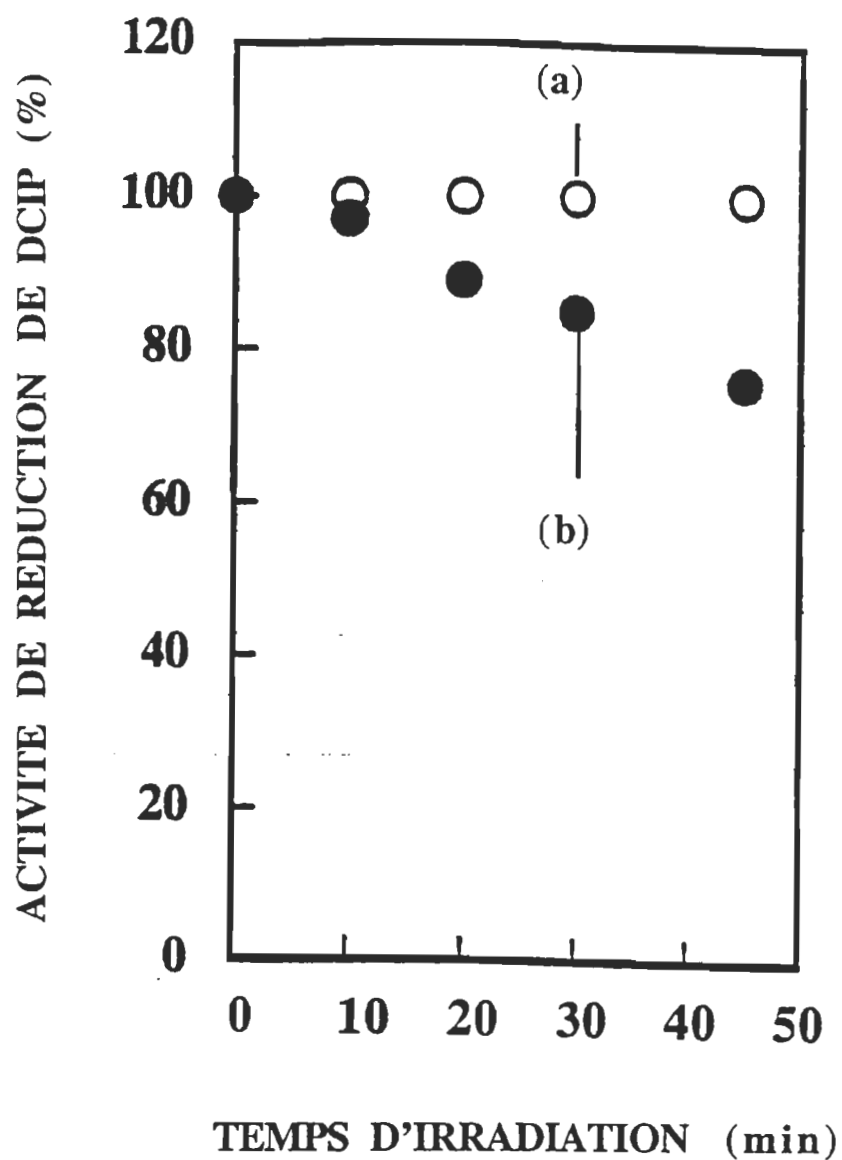


Figure 17. Graphes de la variation de l'activité de réduction de DCIP en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière UV à 226 nm: a) contrôle, b) irradié. Nombre de moles de DCIP (n_{DCIP}) = 700 μmoles , $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

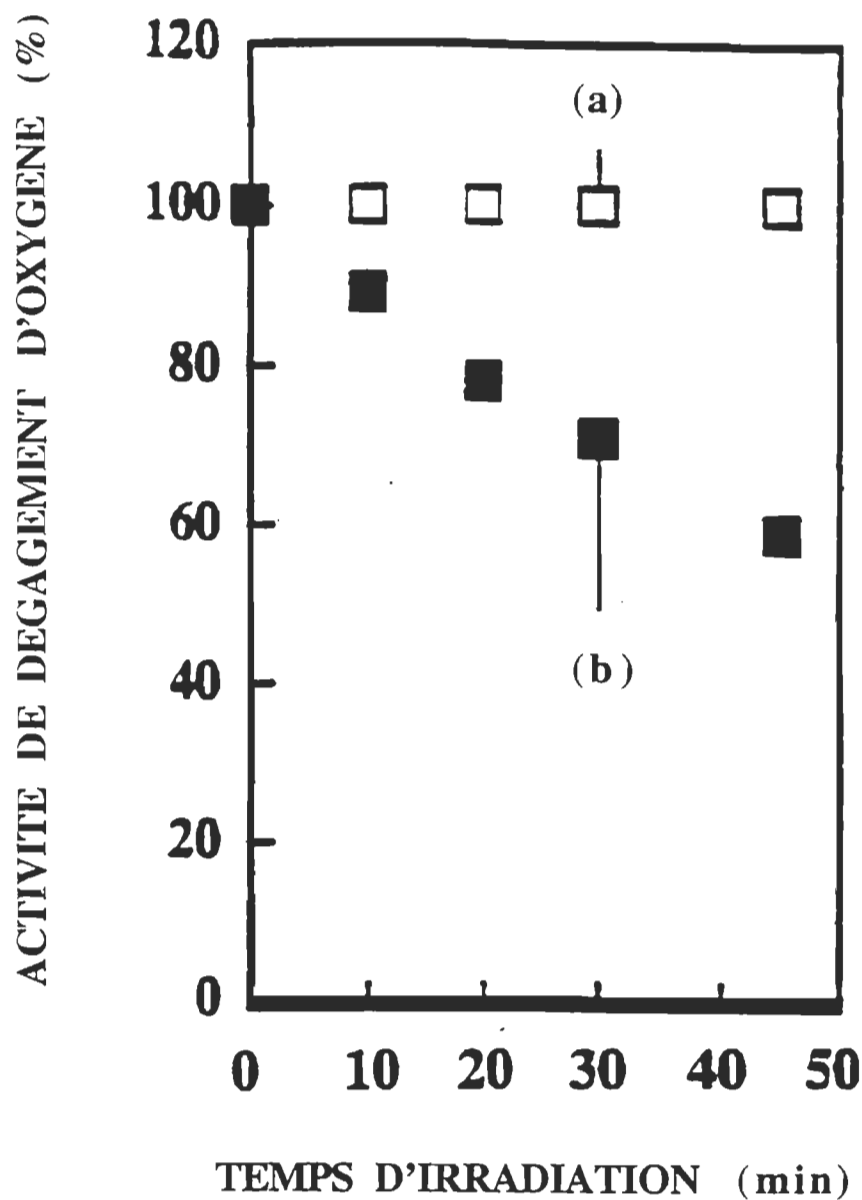


Figure 18. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière UV à 204 nm en présence de DCBQ: a) contrôle, b) irradié. Nombre de moles de DCBQ (n_{DCBQ}) = 700 μmoles , $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

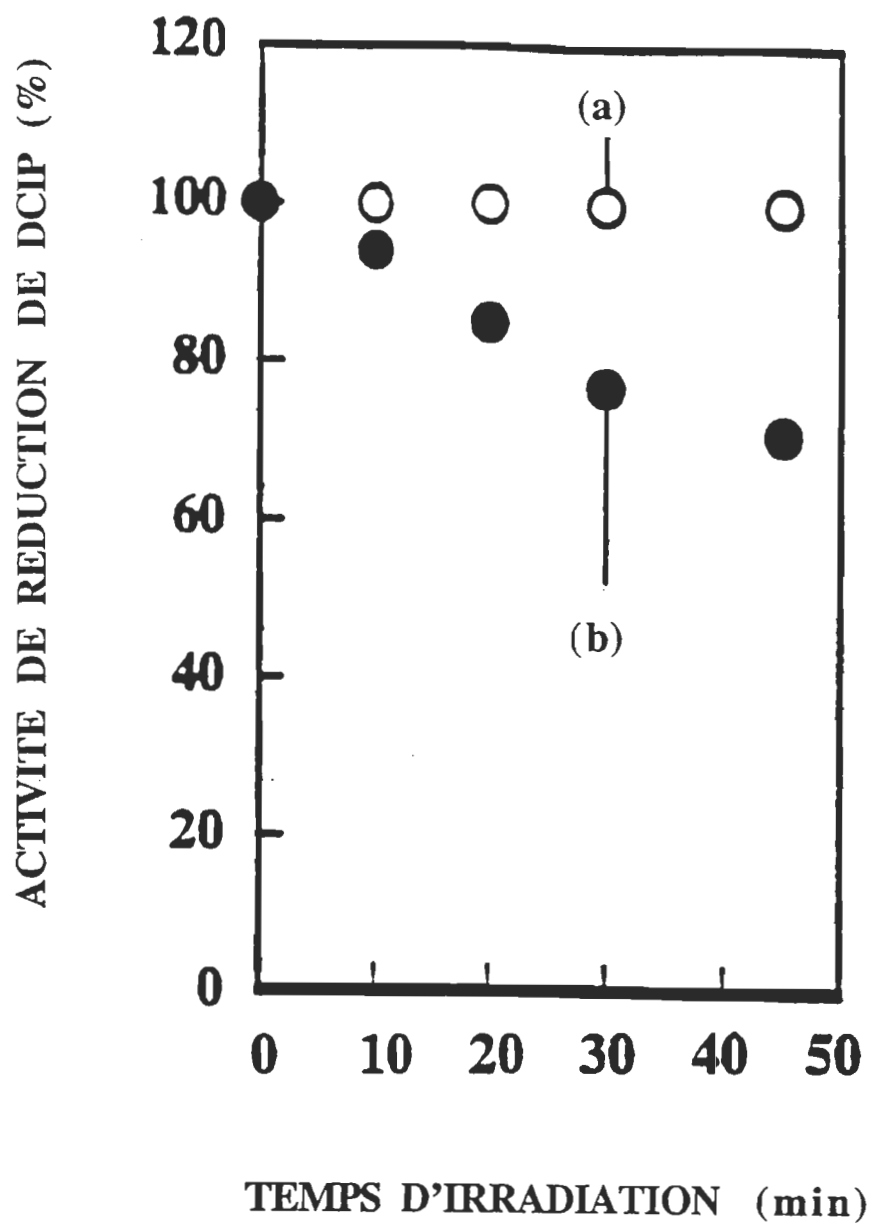


Figure 19. Graphes de la variation de l'activité de réduction de DCIP en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII avec de la lumière UV à 204 nm: a) contrôle, b) irradié. Nombre de moles de DCIP (n_{DCIP}) = 700 μmoles , $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

Tableau 2. Photoinhibition de l'activité de transfert d'électrons de fragments membranaires de PSII après 45 min d'irradiation. Ces résultats proviennent de 9 expériences.

Longueurs d'onde d'irradiation (nm)	Photoinhibition de la réduction de DCBQ (%)	Photoinhibition de la réduction de DCIP (%)
280 (2.0 W . m ⁻²)	94.6 ± 4.0	73.0 ± 2.7
226 (0.5 W . m ⁻²)	31.8 ± 3.6	23.7 ± 1.7
204 (0.5 W . m ⁻²)	40.7 ± 2.2	28.9 ± 2.0

À partir des observations discutées ci-dessus (**tableau 2**), nous pouvons donc considérer la diminution des activités de dégagement d'oxygène (en présence de DCBQ) et de réduction du DCIP comme étant de la photoinhibition induite par les faisceaux monochromatiques UV (**204, 226 et 280 nm**) sur le complexe de PSII, et plus particulièrement sur la chaîne de transfert d'électrons. De plus, les résultats présentés dans le **tableau 2** confirment ainsi notre idée soutenant l'existence de deux sites différents à la face stromale du PSII où interagissent respectivement le DCIP et le DCBQ.

Il faudrait préciser qu'en photobiologie ou en physiologie végétale, le terme photoinhibition est quelquefois utilisé pour désigner non seulement les dommages causés à l'appareil photosynthétique dans les systèmes intacts (plantes et feuilles entières) par la lumière mais aussi certains mécanismes protecteurs qui empêchent la photosynthèse se réaliser de manière efficace [Park et coll. (1996), Demmig-Adams et Adams (1992)]. Dans notre travail, nous considérons que la photoinhibition équivaut tout simplement à la photoinactivation (perte de capacité fonctionnelle) à cause de l'absence de ces systèmes protecteurs et réparateurs dans le complexe de PSII isolé.

IV.1.3. Effet de l'intensité de lumière incidente UV sur l'activité du PSII

Cette partie du travail vise à mettre en évidence, de manière explicite, l'impact du dépérissement de la couche d'ozone stratosphérique sur la photosynthèse. Pour ce faire, nous avons entrepris d'étudier l'effet d'une augmentation du flux incident de photons UV à 280 nm sur des particules de PSII dont l'ADO est de $480.0 \pm 1.6 \mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$. En guise de comparaison, des mesures d'activité de dégagement d'oxygène ont aussi été réalisées suite à un traitement à 204 et 226 nm des échantillons issus de cette même

préparation de PSII. Dans ce cas, l'intensité de lumière incidente UV est maintenue constante, c'est-à-dire $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W.m}^{-2}$.

La **figure 20** montre la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation UV à 204, 226 et 280 nm. Lorsque l'intensité de lumière à 280 nm varie de 1.0 à 2.0 W.m^{-2} , l'amplitude de photoinhibition de l'ADO passe de 43 à environ 75 %. Aussi, l'augmentation de l'intensité de lumière UV de 1 à 2.0 W.m^{-2} (**figure 20**) conduit à une cinétique de type exponentiel. Elle montre un déclin rapide de l'activité suivie d'une tendance vers un état quasi-stationnaire. Cette augmentation du flux de photons UV à 280 nm est caractérisée par une variation de la pente des graphes d'environ -1.0 à -1.6 % ADO.min^{-1} lorsque nous varions l'intensité de lumière UV de 1 à 2.0 W.m^{-2} . Nous pouvons voir à travers cette cinétique l'existence de plusieurs cibles des radiations UV dans le complexe de PSII qui présentent une **photohétérosensibilité**. Les résultats découlant de ces mesures sont présentés dans le **tableau 3**.

De plus, à partir de la **figure 20** nous pouvons voir que la décroissance de l'activité de dégagement d'oxygène à 204 nm (0.5 W.m^{-2}) est plus rapide que celle observée à 226 nm (0.5 W.m^{-2}), qui elle-même s'avère légèrement plus accentuée que la diminution notée à 280 nm (1.0 W.m^{-2}). Ces résultats semblent indiquer que la capacité de photoinhibition de la lumière devient plus grande au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'ultraviolet lointain. Alors, par extrapolation, nous pourrions envisager que dans la nature, un même flux de photons produirait un effet délétère plus grand sur le PSII (**globalement sur la photosynthèse**) à 204 et 226 nm qu'à 280 nm. Cette conclusion paraît tout à fait vraisemblable dans la mesure où les photons rencontrés dans la région de plus courtes longueurs d'onde sont les plus énergétiques. Nous rappelons que l'énergie des photons varie en fonction de λ^{-1} . Le fait que tous les graphes présentent approximativement le

même profil de photoinhibition serait sans doute relié à l'aspect linéaire (certes dominant) du processus de transfert d'électrons qui a lieu dans le complexe de PSII isolé. Que les chromophores cibles soient communs ou différents à ces trois longueurs d'ondes, la séquence réactionnelle affectée par les rayons UV déterminera sans doute la vitesse globale du transfert d'électrons linéaire.

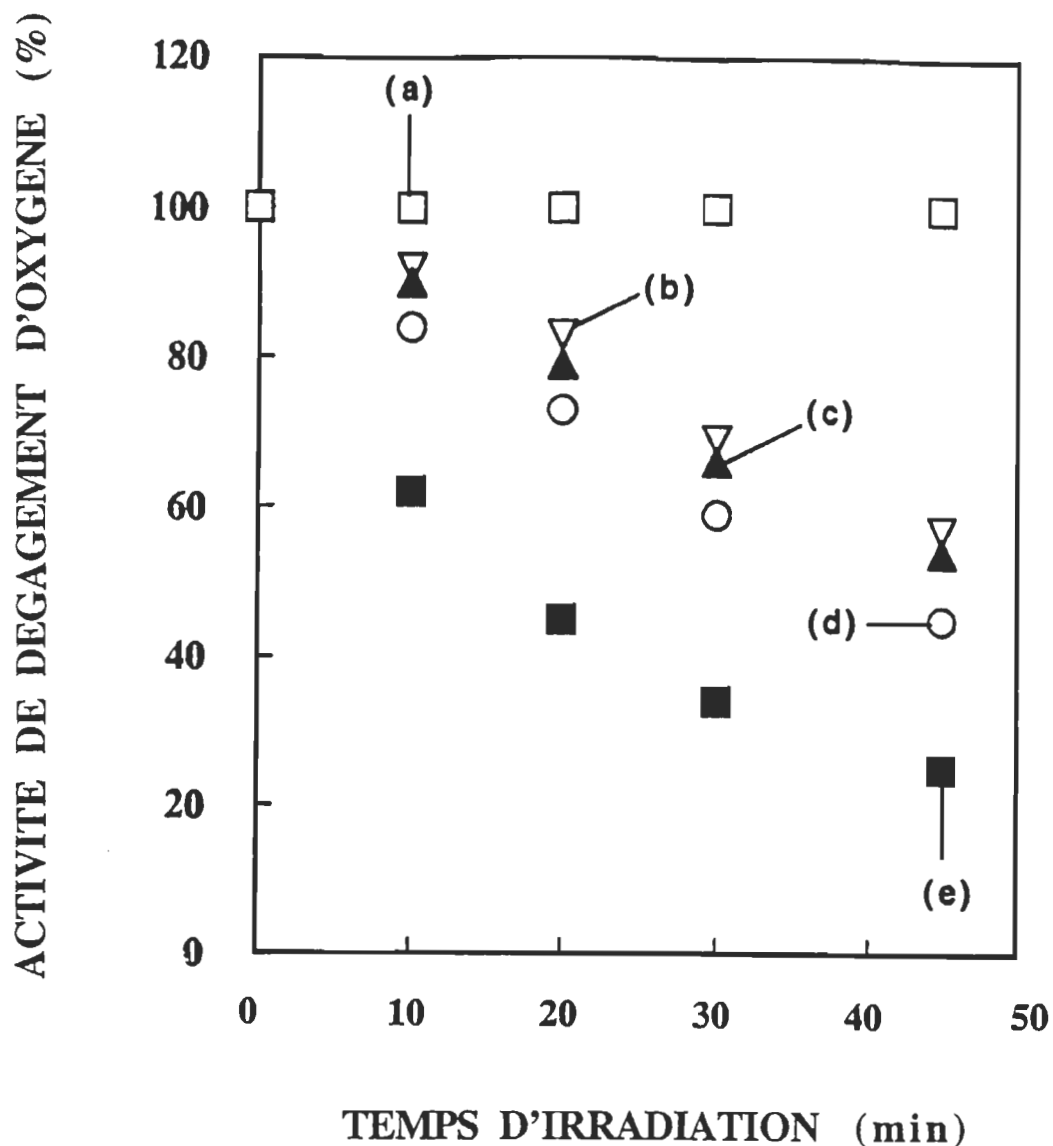


Figure 20. Graphes de la variation de l'activité de dégagement d'oxygène en fonction du temps d'irradiation des particules de PSII en présence de DCBQ: a) contrôle, b) et e) irradiés à 280 nm avec $I_{inc} = 1.0$ et $2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ respectivement; c) irradié à 226 nm avec $I_{inc} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; d) irradié à 204 nm avec $I_{inc} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Nombre de moles de DCBQ (n_{DCBQ}) = 700 μmoles et $[\text{PSII}] = 20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Tableau 3. Simulation du dépérissement de la couche d'ozone stratosphérique: photoinhibition de l'activité de dégagement d'oxygène de fragments membranaires de PSII après 45 min d'irradiation. Ces résultats proviennent de 14 expériences.

Longueurs d'onde d'irradiation (nm)	Photoinhibition de l'activité de dégagement d'oxygène (%)
226 (0.5 W . m ⁻²)	45.8 ± 2.1
204 (0.5 W . m ⁻²)	54.6 ± 2.6
280 (1.0 W . m ⁻²)	42.9 ± 2.0
280 (2.0 W . m ⁻²)	75.1 ± 3.2

IV.1.4. Relation entre l'état physiologique du PSII et le degré de photoinactivation

Une autre observation pertinente découlant de ces mesures est la variabilité de l'effet photoinhibiteur des UV selon le type de préparation de PSII. Outre les résultats rapportés ci-dessus, nous avons aussi obtenu à 280 nm (2.0 W.m^{-2}) des amplitudes de photoinhibition de 90.1 ± 3.2 , 84.8 ± 1.9 , 78.8 ± 2.4 et 70.0 ± 2.9 % après 45 min d'irradiation de particules de PSII issus de plantations d'orge différentes et dont les ADO sont de 380.0 ± 1.7 , 404.8 ± 1.1 , 430.0 ± 1.3 et 492.7 ± 0.8 $\mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. Chaque résultat est obtenu en répétant *au moins quatre fois* la mesure d'activité de dégagement de O_2 . Les pertes d'activité de dégagement d'oxygène après exposition des particules de PSII au rayonnement UV de 280 nm sont respectivement de 342.4, 343.1, 339.0 et 344.7 $\mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. De ces valeurs, il se dégage une moyenne de 342.3 ± 2.1 $\mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. L'activité photosynthétique respective qui résiste à ce rayonnement UV de 2.0 W.m^{-2} après 45 min d'illumination est de l'ordre de 37.6, 61.6, 91.1 et 148.0 $\mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$, avec une moyenne de 84.6 ± 41.2 $\mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$. Cette grande déviation de ± 41.2 $\mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.ml}^{-1}$ montre clairement qu'en réalité c'est le degré de résistance à la photoinactivation (DRP) par les UV qui varie d'une préparation (ou extraction) à l'autre. Cette constatation nous permet de conclure que moins les fragments membranaires de PSII sont actifs plus importante est l'effet photoinhibiteur du rayonnement UV. À partir de cette observation, nous pensons que l'ampleur de l'action délétère exercée *in vivo* par de faibles flux de photons UV sur le système métabolique des plantes serait conditionnée d'une certaine façon par leur état physiologique. Dans nos conditions expérimentales, il nous apparaît difficile de relier cette variabilité du DRP aux mécanismes photorégulateurs qui influencent la sensibilité des systèmes photosynthétiques dans les plantes ou les feuilles entières [Adamse et coll. (1992, 1994)]. Adamse et coll. (1992, 1994) ont montré que les plantes qui se développent en

altitude ont une plus forte résistance au rayonnement UV. Dans le cas présent, non seulement nous n'utilisons que des particules de PSII isolé, mais aussi des plantules d'orge qui ont subi la même photoadaptation au cours de leur croissance. La distance d'environ 35 cm qui sépare la source de lumière blanche des plantules est telle que toute variation de luminosité peut-être considérée comme négligeable. En d'autres mots, la superficie du bac ainsi que la distance entre la plantation et la source de lumière de croissance conditionnent les plantules à une luminosité homogène. Par exemple, le fait que nous obtenions une amplitude de photoinhibition de l'ordre de 90 % avec du PSII dont l'ADO est de 380.0 ± 1.7 $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$ serait sans doute relié à la présence d'une proportion assez élevée de particules moins stables dans l'échantillon utilisé comparativement à celui qui montre une activité de 492.7 ± 0.8 $\mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$.

IV.2. Discussion

IV.2.1. Effets du rayonnement UV sur les pièges d'énergie dans le PSII

À travers cette partie de notre travail, nous avons noté que l'irradiation continue des fragments membranaires de PSII avec la lumière UV à 280, 226 et 204 nm (voir **figures 14-20**) conduit à l'inhibition de l'activité de transfert d'électrons exprimée sous forme de dégagement d'oxygène et de réduction de DCIP. Cette diminution de l'activité des particules de PSII est non linéaire. De plus, lorsque le traitement aux rayons UV se fait à 2.0 W.m^{-2} , l'action photo-inhibitrice induite par les photons UV se traduit par une décroissance rapide de l'activité de transport d'électrons suivie d'une phase lente qui tend probablement vers un état stationnaire. Cette décroissance de l'activité des particules de PSII peut être décrite par une fonction de type exponentiel. L'amplitude de photo-inhibition à l'état stationnaire dépendra du flux de photons UV et de la durée d'irradiation. Elle constituera une indication de l'efficacité de l'action de la lumière UV sur le fonctionnement des complexes de PSII.

Cette photo-inactivation irréversible caractérisant l'action spécifique du rayonnement UV à 204, 226 et 280 nm est interprétée comme la conséquence directe d'une modification du système, et peut donc être utilisée comme indicateur de dommage dans le PSII et plus spécifiquement dans la chaîne de transport d'électrons. La photomodification du PSII se présenterait sous forme de changements conformationnels (modification des liaisons intermoléculaires ou détérioration des forces de cohésion entre les composantes moléculaires) ou de lésion (de rupture des liaisons intramoléculaires) conduisant à la destruction de la structure des molécules. À cause des faibles intensités de lumière UV utilisées et du fait que le déclin de l'activité s'observe déjà très bien dans les premières minutes d'irradiation, nous émettons une certaine réserve en ce qui concerne la brisure des

liaisons intramoléculaires. Si la concentration de fragments membranaires de PSII est maintenue constante à $20 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$, toute augmentation d'intensité de lumière UV se rapprochant de celles utilisées par Renger et coll. en 1989 (50 à $100 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$) diminuerait la durée globale de photo-inactivation. C'est dans ces conditions d'intensités élevées qu'il devient approprié de parler de rupture systématique de liaisons intramoléculaires en considérant l'intervalle de temps d'illumination [0-45 min]. Nous croyons toutefois que ce phénomène peut se produire dans nos conditions expérimentales avec le prolongement de l'exposition. Cette photo-inactivation irréversible de la capacité fonctionnelle du PSII peut être qualifiée d'**effet de tout ou rien** exercé par les rayons UV sur les particules [Greenberg et coll. (1989)]. Cela signifie qu'une fois absorbée, la lumière UV déclenche des modifications structurales au niveau des cibles moléculaires. Ces changements qui s'opèrent au cours de l'irradiation conduisent à l'abolition de l'activité de transport d'électrons.

Les résultats présentés dans ce chapitre nous permettent de voir que la cinétique de photo-inactivation des fragments membranaires de PSII semble dépendre fortement de l'intensité de rayons UV. Par exemple, pour des intensités de lumière UV $\sim 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, il devient judicieux de s'attendre à une cinétique au moins triphasique. Dans ces conditions, on aurait une latence dans les premiers instants d'irradiation. Elle serait ensuite suivie d'une décroissance non linéaire, mais probablement plus lente que celle observée à 0.5 et $1.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. La troisième partie décrirait une tendance vers un état stationnaire (indication de la photosynthèse résistante). Par contre, à des intensités de plus en plus élevées ($\sim 2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$), l'effet destructeur de la lumière UV sur les particules serait accéléré. Ainsi, l'effet de photo-inhibition serait de moins en moins simulé par une fonction de type exponentiel à cause de la tendance rapide vers zéro de l'amplitude de photosynthèse résistante.

À cause de la complexité des systèmes photosynthétiques (feuilles entières, chloroplastes, thylacoïdes, PSII, etc.) la cinétique de photo-inhibition peut faire l'objet de multiples interprétations. Ainsi, la diminution globale de l'activité de transport d'électrons observée à chacune des longueurs d'onde (pour chaque échantillon de PSII) traduirait un déclin du nombre de particules fonctionnelles de PSII en fonction de la durée d'irradiation. De plus, le tendance biphasique observée spécialement à $2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ pourrait constituer une indication de la manifestation de comportements différents (au moins deux) des particules de PSII en présence de la lumière UV. Ces types de comportements seraient reliés à la nature hétérogène du complexe PSII (PSII α , PSII β et PSII non réducteur des quinones) dans les membranes des thylacoïdes et dans les membranes intergranaires.

Selon les travaux de Melis et Homann (1976), Melis et Duysens (1979), Black et coll. (1986), Park et coll. (1995), Schreiber et coll. 1995, Guenther et Melis (1990) et Svensson et coll. (1991), les complexes de PSII existent sous forme de PSII α , PSII β et PSII non réducteur des quinones. Les dimères de PSII α (75-80 % de la population totale) localisés dans les disques granaires et dotés à la fois de LHC-II interne et externe, sont plus stables que les monomères de PSII β et PSII non réducteur des quinones. Ces deux dernières sous-populations de PSII (PSII β et PSII non réducteur des quinones) représentent 20-25 % du nombre total de particules de PSII dans le chloroplaste. Ces monomères de PSII ne contiennent seulement que du LHCI interne [Ghirardi et Melis (1988), Greene et coll. (1988), Park et coll. (1995), Santini et coll. (1994)].

À la lumière de ces connaissances, nous croyons que la chute l'activité dans les premières minutes d'irradiation implique majoritairement les monomères de PSII dans lesquels les changements conformationnels vont se produire plus rapidement à cause de

leur instabilité [Park et coll. (1995)]. Aussi, la tendance vers un état stationnaire est conditionnée par le comportement des dimères de PSII $_{\alpha}$. En d'autres mots, c'est le comportement de ces dimères vis-à-vis des rayons UV qui détermine sans doute l'amplitude de la photosynthèse résistante. Dans cette section de notre travail, nous n'avons pas discuté la sous-population de PSII non réducteur des quinones dans le processus de photo-inhibition parce qu'ils ne participent au transport d'électrons [Guenther et Melis (1990)].

IV.2.2. La théorie des cibles d'Altman et coll. (1970)

Renger et coll. (1989) ont obtenu des résultats similaires aux nôtres en utilisant du PSII extrait des thylacoïdes d'épinard, c'est-à-dire du PSII $_{\alpha}$. Cependant, leur interprétation de la décroissance non linéaire de l'activité de transport d'électrons due aux rayons UV à 320-280 nm est fondée sur le changement graduel de conformation de l'enzyme de dégradation de l'eau. La vision de ces auteurs n'infirme nullement pas notre argumentation, car nous pensons que le degré de photo-inactivation d'une particule de PSII est fonction de la sensibilité de la ou des cibles moléculaires qui absorbent la lumière UV à une longueur d'onde donnée. Pour le comprendre, faisons une approche explicative (*avec prudence*) en utilisant certains critères de la théorie de cibles d'Altman et coll. (1970). Pour ce faire, nous allons nous référer à la description du PSII faite au **Chapitre II** ainsi qu'à la description des cibles potentielles définies dans la **figure 4** (Objectif du travail, **Capitre I**).

La *théorie de cibles* a été élaborée (d'après plusieurs approximations et considérations) par Altman et coll. (1970). Elle a été ensuite utilisée par Lee et coll. (1990), Park et coll. (1995, 1996) et Sinclair et coll. (1996) pour interpréter l'effet des

hautes intensités de lumière visible sur la photosynthèse produite dans les feuilles entières de pois. Son applicabilité requiert une série de conditions énoncées ci-dessous :

- 1) le matériau exposé à la radiation doit être un organisme vivant contenant au moins une cible,
- 2) l'interaction de la radiation avec cet organisme vivant doit être aléatoire,
- 3) un coup ou une interaction de la radiation avec la cible tue, inactive, ou induit un effet radiobiologique dans l'organisme, et
- 4) la probabilité de produire un coup est proportionnelle à la dimension de la cible.

D'après les **critères 1, 2 et 3** énumérés ci-dessus, on peut concevoir que la chute globale de l'activité observée dans ce travail prouve en elle-même que le complexe de PSII renferme au moins une cible moléculaire de chaque rayonnement UV (204, 226 et 280 nm). Pour être plus explicite, soulignons que l'utilisation de DCIP et de DCBQ comme accepteurs exogènes a conduit à une différence de photo-inhibition de l'activité de transport d'électrons d'environ 22 % (voir **figures 14 et 15**). Comme l'avons déjà souligné en haut, cette différence est indépendante du facteur de saturation des accepteurs exogènes dans nos conditions expérimentales. Or, sachant que les molécules de DCBQ et de DCIP sont réduites en DCBQH₂ et DCIPH₂ à la face stromale du PSII, il devient alors fort probable que cette région (du site de Q_B et même de Q_A allant au "pool" de plastoquinones réduites) montre une sensibilité aux radiations monochromatiques UV utilisées dans ce travail. Cette hypothèse écarte la possibilité que le centre de Mn [Renger et coll. (1989), Post et coll. (1996)] ou le site de Q_A [Melis et coll. (1992)] représente la cible unique des radiations UV dans le PSII. Nous pourrions alors attribuer cette différence d'environ 22 % à l'action délétère des radiations UV sur des constituantes autres que ces deux sites moléculaires. Ce résultat montre qu'il existe plus d'une cible moléculaire des photons UV

(204, 226 et 280 nm) dans le complexe de PSII extrait de l'orge. De plus, des preuves spectroscopiques (voir **figure 4** au **Chapitre I**) permettent de croire à la localisation des cibles potentielles des rayons UV dans le centre réactionnel ainsi qu'au niveau des côtés donneur et accepteur du PSII. Sur cette base, cette action photo-inhibitrice des radiations UV sur l'activité de transport d'électrons pourrait être décrite approximativement par le modèle "**d'un coup et de cibles multiples**" de la théorie d'Altman et coll. (1970).

Dans ce modèle, Altman et coll. (1970) considèrent le cas d'un organisme vivant qui renferme plusieurs (n) cibles. Pour tuer ou inactiver cet organisme, chacune des cibles doit recevoir un coup. La perte de la capacité fonctionnelle surviendra uniquement lorsque toutes les cibles auront reçu un coup. L'utilisation de ce modèle semble appropriée dans ce travail parce qu'il permet d'explicitier la relation entre l'action inhibitrice des faibles intensités de lumière UV et l'hétérosensibilité des cibles dans le PSII. Partant du fait que les échantillons de PSII utilisés dans ce travail sont très dilués ($20 \mu\text{g Chl.ml}^{-1}$) et un parcours optique de 3-10 mm, alors nous croyons que toutes les particules reçoivent la même quantité d'énergie UV. Ainsi, nous concevons la diminution de l'activité photosynthétique au niveau de chaque particule comme le résultat d'un changement progressif et irréversible de conformation subi par les cibles moléculaires, particulièrement par les intermédiaires de transport d'électrons [Renger et coll. (1989)]. L'ampleur de cette modification structurale dépendra de la durée d'exposition, de l'intensité de la radiation UV et de la sensibilité de chaque cible. La photo-inhibition définitive de l'activité de la particule de PSII en présence des faibles intensités de lumière UV (0.5 et 1.0 W.m^{-2}) se produirait lorsque chaque cible aurait subi un certain degré de changement conformationnel, selon la durée de l'exposition.

Bien que la théorie des cibles d'Altman et coll. (1970) soit quelque peu limitée dans son utilisation pour décrire les effets des rayons UV sur les systèmes photosynthétiques (plantes, chloroplastes, thylacoïdes, PSII, etc) à cause de son fondement [voir Renger coll. (1991)], il n'en demeure pas moins qu'elle nous a permis d'établir un *lien entre l'hétérogénéité des particules de PSII et la photohétérosensibilité des cibles moléculaires*. Nous croyons que ces deux concepts sont indissociables dans nos conditions expérimentales.

IV.2.3. Cibles moléculaires potentielles des rayons UV:

côté accepteur d'électrons et centre réactionnel

Nous avons vu que la perte de la capacité fonctionnelle par les fragments membranaires de PSII peut être perçue comme la conséquence d'une modification progressive induite au niveau de certaines composantes moléculaires (**cibles**) par les faibles doses de rayons UV. La question qui se pose à ce stade de notre travail est l'identification sans équivoque de ces composantes moléculaires ou chromophores oxydo-réducteurs dont l'interaction avec les photons UV serait susceptible de causer un affaiblissement de l'intégrité fonctionnelle du PSII. Résoudre un tel problème ne serait pas chose aisée à cause de la complexité de la suprastructure du PSII [Boekema et coll. (1995), Lyon et coll. (1993), Dau (1994), Santini et coll. (1994) et Murata et Miyao (1989)], de la méconnaissance du rôle précis de certaines de ses composantes moléculaires [Debus (1992)] et des photorécepteurs primaires des rayons UV dans le PSII. Notre tentative d'identification des intermédiaires de transfert d'électrons comme cibles potentielles du rayonnement UV (204, 226 et 280 nm) se fera en fonction de leurs caractéristiques spectroscopiques UV-VIS et infrarouge. Pour ce faire, nous adopterons une démarche analytique qui vise à montrer l'implication possible de chaque intermédiaire oxydo-réducteur de transfert d'électrons dans

le processus d'inactivation du PSII induit par le rayonnement UV. Cette démarche nous permettra de formuler des hypothèses dont la vérification se fera au **Chapitre V** dans l'étude des effets du rayonnement UV sur la structure du PSII.

Les résultats présentés ci-dessus suggèrent que des intermédiaires de transport d'électrons de la séquence P680*PhéQAQB sont possiblement affectés par les radiations UV. En nous référant aux travaux de Fragata (1991) et Fragata et coll. (1988) nous remarquons que la Chl *a* absorbe de la lumière visible et ultraviolette jusqu'au voisinage de 240 nm (voir **figure 4A**). La P680 étant un dimère de Chl *a* (transitions électroniques plus faibles: absorbe légèrement vers les hautes longueurs d'onde), il apparaît vraisemblable qu'elle montre à peu près la même caractéristique spectroscopique UV-VIS dans cette région. Partant de cette conclusion, nous présumons que l'irradiation des fragments membranaires de PSII pendant 45 min avec de la lumière UV pourrait induire certains changements au niveau de la structure moléculaire de la P680, du moins à 280 nm. Notre argumentation s'appuie sur les travaux de Panagopoulos et coll. (1990) qui font état de la diminution de la teneur en Chl *a* dans les feuilles entières exposées à la lumière UV. Comme nous l'avons déjà mentionné au **Chapitre II**, il existe une seule molécule de P680 par CR-PSII et elle est capitale pour la conversion énergétique qui a lieu dans la phase primaire de la photosynthèse. Alors, toute photomodification ou photodestruction de sa structure moléculaire occasionnerait un blocage du centre réactionnel. Ainsi ce dernier (CR-PSII) fonctionnerait simplement comme une voie de dissipation d'énergie d'excitation de la P680 et ne serait jamais capable de supporter un flux d'électrons. Bien que les particules de PSII semblent réagir de la même manière aux trois longueurs d'onde, la possibilité d'une photodégradation directe de la P680 à 204 et 226 nm semble difficilement concevable à cause de la faible absorption des pigments chlorophylliens dans cette région du spectre solaire (UV lointain).

Selon Shepanski et coll. (1984) tous les pigments que l'on retrouve dans les complexes antennes peuvent contribuer au processus photosynthétique. Ainsi, les excitons formés au niveau des sites des molécules de caroténoïdes et de Chl *b* migrent par résonance (processus de transfert d'énergie non radiatif et non collisionnel) [Foyer (1984)] jusqu'à ceux de Chl *a* dont le niveau singulet est plus bas du point de vue énergétique. À son tour, la Chl *a** envoie l'onde excitatrice à la P680 pour l'amener à un niveau énergétique supérieur (P680*, ou exciton de P680) précédant la séparation des charges. Or, Okada et coll. (1976) ont rapporté que l'irradiation UV-C augmentait les processus d'extinction non radiative au niveau de P680. Dans la même voie, Renger et coll. (1991) ont émis l'hypothèse de la formation de désactivateurs (quencher) ou pièges à excitons par les radiations UV-B (50 à 100 W.m⁻²) dans un processus non photochimique dans le PSII. En vertu de ces informations, nous pensons que l'irradiation à 204, 226 et 280 nm provoque probablement la production de ce type d'extincteurs d'excitons dans les particules de PSII utilisées dans ce travail. Cet effet a sans doute une incidence néfaste sur la transmission de l'onde excitatrice jusqu'au centre photochimique ou sur la séparation de charges entre la P680* et la Phé lorsque nous mesurons l'activité des particules de PSII traitées à l'ultraviolet en présence de la lumière visible (375 W.m⁻²). L'ampleur de l'action de désactivation des excitons pigmentaires, plus spécifiquement de la P680*, par ces centres d'extinction supplémentaires produits par la radiation UV dépendrait de l'intensité incidente de lumière, de la durée de l'irradiation et de leur nombre. Le travail de Renger et coll. (1991) n'a cependant pas permis d'identifier la nature de ces désactivateurs supplémentaires d'excitons créés par la radiation UV-B dans le CR-PSII. L'effet de ces pièges à exciton est indépendant de l'état fonctionnel du centre réactionnel [Renger et coll. (1991)]. Cependant, le mécanisme de perte d'intégrité fonctionnelle du PSII est perçu d'une autre façon par Lee et coll. (1990), Park et coll. (1995, 1996) et Sinclair et coll. (1996). En utilisant la théorie des cibles d'Altman et coll. (1970), ces auteurs proposèrent

que la photoinactivation du PSII commence lorsqu'une petite fraction de pigments (structure non influencée par l'illumination de croissance) devient non couplée énergétiquement au reste de l'unité photosynthétique. De là, ces pigments photosynthétiques (**antennes**) ne sont plus en mesure d'assumer le transfert d'excitons jusqu'au P680. Selon ces auteurs, c'est la désexcitation de ce groupe de molécules pigmentaires qui fournit de l'énergie conduisant au dommage du PSII. Il faudrait néanmoins préciser que Park et coll. (1995, 1996) et Sinclair et coll. (1996) ont effectué leurs études sur disques de pois en utilisant des intensités de lumière visible variant de 100 à 3 000 $\mu\text{moles photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En tenant compte de leurs conditions expérimentales, les propositions de ces auteurs paraissent tout à fait justifiées dans la mesure où ce sont les pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) qui sont les photorécepteurs de la lumière visible dans le PSII. Dans ces conditions de hautes intensités de lumière visible, il existe une forte probabilité de voir un photoblanchiment direct et rapide des pigments chlorophylliens, y compris ceux qui constituent la petite fraction dont parlent Lee et coll. (1990), Park et coll. (1995, 1996) et Sinclair et coll. (1996). Cependant, nous croyons que le mécanisme de photoinactivation du PSII exposé à la lumière UV (204, 226 et 280 nm) se présenterait autrement à cause de la nature des photorécepteurs primaires qui sont probablement différents. D'ailleurs, non seulement les photorécepteurs des radiations UV dans le PSII sont méconnus, mais ils sont aussi une source de conflits dans la littérature depuis environ deux décennies. C'est probablement ces raisons qui ont conduit le groupe de Renger et coll. (1989, 1991) ainsi que celui de Melis et coll. (1992) à ne pas considérer dans leurs études les pigments photosynthétiques du PSII comme des cibles privilégiées des radiations UV-B. Or, comme nous l'avons montré ci-dessus, les pigments photosynthétiques responsables de la dynamique excitonique absorbent pourtant de manière appréciable dans la région de 320-280 nm (voir **figure 4**), et sont donc susceptibles d'être photo-oxydées (*rapidement*) par la lumière UV.

Outre la P680, la Phé est aussi un pigment chlorophyllien important dans le processus de transfert d'électrons. Elle est le premier accepteur d'électrons. Melis et coll. (1992) ont mesuré les changements d'absorbance dans les membranes de thylacoïdes traitées aux UV en utilisant un filtre d'acétate de cellulose dont le profil optique d'émission des radiations UV est de 0 % de transmission à 275 nm et à 400 nm, 50 % à 295 et 335 nm puis maximale à 302 nm. Ils sont arrivés ainsi à la conclusion que le transfert d'électrons du P680 à la Phé n'était pas affecté de façon significative. En d'autres mots, selon leur étude, ni la structure chimique de la P680, ni celle de la Phé n'ont subi de dommages susceptibles d'empêcher la séparation des charges. Aussi, selon le travail de Fragata et coll. (1988), la Phé a montré une absorption nettement plus faible que la Chl a dans la région UV (280-200 nm) considérée dans le cadre de ce travail. Ces données nous permettent d'écarter la Phé comme une cible majeure de ces faibles intensités de rayonnements UV à 280, 226 et 204 nm. *Si la possibilité d'une photodégradation directe des pigments chlorophylliens du centre réactionnel reste à prouver, qu'en est-il des plastoquinones?*

Les mesures de fluorescence variable faites par Kulandaivelu et Noorudeen (1983) leur ont permis de conclure que les radiations UV-C ($\lambda < 280 \text{ nm}$) attaquent principalement les plastoquinones, faisant du CR-PSII l'unique cible des radiations UV dans le PSII. Puisque les trois longueurs d'onde que nous utilisons se trouvent dans cette région du spectre solaire, nous sommes tentés de voir l'inactivation des fragments membranaires de PSII comme la conséquence de l'action délétère des radiations UV sur la Q_A et/ou la Q_B ou même le "pool" de plastoquinones réduites. D'un autre côté, Melis et coll. (1992) rapportèrent que la photoinhibition de l'activité photosynthétique est due à un effet direct de la radiation UV sur la Q_A quoique ces auteurs n'aient pas travaillé dans la même région du spectre d'absorption UV que Kulandaivelu et Noorudeen (1983). En raison de ces données, il est possible de voir les plastoquinones comme les principales cibles des UV-B et des UV-C. Cela est en

partie vrai parce que les quinones ou certaines de leurs formes réduites (**plastoquinols**) absorbent fortement aux environs de 310 nm [Dekker et coll. (1984a, 1984b), Van Gorkom et coll. (1982), Kohen et coll. (1995)]. Nos résultats semblent toutefois nous conduire à une conclusion différente de celles des auteurs cités ci-dessus.

S'il était vrai que la structure moléculaire des quinones, plus spécifiquement celle de Q_A a subi une modification suite à l'absorption des radiations électromagnétiques UV dans le complexe de PSII, nous aurions obtenu la même activité de transfert d'électrons en présence des deux accepteurs exogènes, car non seulement le DCIP et le DCBQ sont réduits à l'extrémité stromale du PSII, mais aussi le transfert d'électrons aurait été bloqué entre la $Phé^-$ et la Q_A . Étant donné que nos résultats favorisent le phénomène contraire, il nous apparaît peu probable d'envisager l'abolition du processus de transfert d'électrons comme la conséquence d'une recombinaison de charges entre la $P680^+$ et la $Phé^-$. Notre conclusion rejoint celles qui se dégagent de plusieurs études antérieures (voir Bornman et coll. 1984) contredisant les travaux de Kulandaivelu et Noorudeen (1983) où il a été conclu que les UV-C ($\lambda < 280 \text{ nm}$) n'exerçaient aucun effet perceptible de dégradation sur les quinones. La conclusion à laquelle nous aboutissons apparaît judicieuse parce que même à 280 nm (filtre d'interférence de bande passante d'environ 5 nm de largeur), il serait peu probable de provoquer une excitation des quinones capable de conduire à la photomodification ou photodestruction directe des doubles liaisons du noyau aromatique. Néanmoins, la différence notée au niveau de l'activité de transfert d'électrons avec l'utilisation du DCIP et DCBQ constitue une indication de l'implication du côté accepteur dans le processus de photo-inhibition. Pour le démontrer, reportons-nous aux travaux de Purcell et Carpentier (1993) portant sur l'altération du côté stromal du photosystème II par le diphénylcarbazine (DPC). Ces auteurs ont montré que le DPC inhibe fortement le dégagement d'oxygène dans les membranes des thylacoïdes quand le DCBQ est utilisé comme accepteur. Cependant

lorsque le DCIP est utilisé en remplacement du DCBQ, la photoréduction de ce second accepteur n'est pas affectée parce que le DPC altère seulement le site de liaison du DCBQ. Selon Purcell et Carpentier (1993), ce site serait en fait celui de Q_B . Si la photoréduction de DCIP n'est pas affectée, c'est parce que cette molécule phénolique n'interagit pas directement avec le site de Q_B . Le DCIP est plutôt réduit au niveau du "pool" de plastoquinone. L'observation de Purcell et Carpentier (1993) appuie notre hypothèse selon laquelle la réduction de ces deux accepteurs suivrait deux voies totalement différentes au niveau stromal du PSII. Par analogie avec l'action du DPC, nous pourrions attribuer l'affaiblissement plus important de la vitesse de transfert d'électrons observée en présence de DCBQ à l'action délétère exercée par la radiation UV sur le site de Q_B ou sur certaines composantes moléculaires au niveau stromal du PSII. Cette action se traduirait probablement par un délogement des molécules de Q_B suite à la rupture de la liaison Q_B -D1. Or le "pool" de plastoquinones duquel le DCIP reçoit ses électrons est placé après la Q_B sur le schéma en Z de Hill [voir **figure 9**]. Donc, il semble logique que le transfert d'électrons du CR-PSII vers le "pool" de plastoquinones passe obligatoirement par la Q_B . Si la radiation UV provoque une délocalisation de Q_B relative à la rupture de la liaison Q_B -D1 ou un changement conformationnel au niveau du site de Q_B , alors l'amplitude de photoinhibition de l'activité de transfert d'électrons devrait être la même en présence des deux accepteurs exogènes, ce qui n'est pas le cas. Donc, il s'avère plus probable que le site de DCBQ soit différent de celui de Q_B . De plus, nous pensons que la face stromale du PSII comporte des sites d'interaction propres à chaque dérivé quinolique. Vraisemblablement, ils sont situés à proximité du site de fixation de Q_B . C'est sans doute la raison pour laquelle la Q_B^- peut réduire de façon plus rapide et efficace le DCBQ. Lorsque les fragments membranaires du PSII sont irradiés avec la lumière UV, ce site subit un changement conformationnel ou une photodégradation empêchant les molécules de DCBQ de s'y fixer, contrairement au "pool" de PQH_2 qui demeure probablement in affecté dans nos conditions

expérimentales. Puisque nous obtenons le même type de résultats à 280 nm qu'à 226 et 204 nm, il apparaît fort probable que le site protéinique de DCBQ renferme des acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine).

IV.2.4. Cibles moléculaires potentielles des rayons UV:

côté donneur d'électrons

À l'instar de Renger et coll. (1989), nous pensons que la grande partie de la photoinhibition provient de l'action délétère des rayonnements ultraviolets sur le côté donneur du PSII. Ainsi, à travers ces prochaines lignes, nous tenterons de démontrer l'implication possible des intermédiaires oxydo-réducteurs engagés dans le processus de transfert d'électrons qui se déroule dans cette portion. Les principaux intermédiaires de transport d'électrons qui s'y rencontrent sont le centre de manganèse (CMn) et le radical de tyrosine 161 (Tyr161 ou TyrZ) [Dau, (1994), Miller et Brudvig (1991)].

De prime abord, il faut rappeler que le transport d'électrons du CMn jusqu'au "pool" de plastoquinones réduites s'effectue de façon linéaire. Cela sous-entend qu'une action de la lumière UV n'importe où dans la chaîne de transport d'électrons conduirait à la même cinétique de photoinactivation de l'activité de dégagement d'oxygène. Néanmoins, en appuyant nos résultats sur des preuves expérimentales rencontrées dans la littérature [Krestschmann et Witt (1993), Govindjee et Colemann (1990), Dekker et coll. (1984a, 1984b), Krestschmann et coll. (1988), Lavergne (1987, 1986)], il apparaît fort probable que le centre de manganèse (site catalytique d'oxydation de l'eau conduisant à la production de l'oxygène moléculaire) soit une cible hautement impliquée dans l'arrêt de l'activité du PSII provoquée par l'absorption des radiations UV. Notre investigation se fait dans une perspective visant à montrer que les radiations UV peuvent influencer le fonctionnement du

CMn en agissant à deux niveaux: interne (**tétramère**) et externe (**les ligands de coordination**). Un modèle de sa structure moléculaire est présenté à la **figure 7**.

Il a été prouvé que les complexes de Mn absorbent les rayonnements ultraviolets de façon caractéristique [Krestschmann et Witt (1993), Govindjee et Colemann (1990)]. De plus, les travaux de Dekker et coll. (1984a, 1984b) présentent des spectres de différence d'absorption associés aux transitions S_0-S_1 , S_1-S_2 , S_2-S_3 et S_3-S_0 . Chacune de ces transitions est sensée correspondre à l'oxydation d'un ion Mn (III) en Mn (IV). Cependant, selon Krestschmann et coll. (1988) et Lavergne (1987, 1986), les transitions S_0-S_1 et S_1-S_2 correspondent en principe à l'oxydation de l'ion Mn (II) en Mn (III) et de Mn (III) en Mn (IV), respectivement. Indépendamment des interprétations fournies par chaque auteur au sujet de ces transitions, les spectres présentent une variation d'absorbance appréciable dans la région de 280 nm, mais nettement faible pour $\lambda < 230$ nm. Puisque ces changements d'absorbance impliquent l'oxydation d'ion Mn^{+n} en $Mn^{+(n+1)}$, une action ionisante directe de radiation UV à 280 nm qui déstabiliserait les atomes de Mn peut être envisageable. En vertu du caractère instable du Mn (IV), nous considérons qu'au-delà d'un degré d'oxydation de III, le tétramère pourrait subir une désorganisation totale, affectant le mécanisme d'échange de molécules d'eau entre le complexe de Mn et le milieu extérieur. Il en résulterait comme conséquence évidente l'arrêt de la production d'oxygène. Mais faire passer les ions Mn d'un état d'oxydation de II à VII nécessiterait sans doute une quantité d'énergie lumineuse différente de celle qui est utilisée dans ce travail. Cette supposition est émise en tenant compte de la stabilité des complexes de Mn (II) et Mn (III) en solution aqueuse [Douglas et coll. (1983)]. Bien que Renger et coll. (1989) aient noté une baisse du nombre des atomes de Mn dans les fragments membranaires de PSII lors de leurs mesures de photoinhibition de la réduction de DCIP, rien n'indique que cette perte soit reliée à une action ionisante poussée des radiations UV-B sur ces ions métalliques. Aussi, à ce stade du

travail, rien ne nous permet d'affirmer la réalisation d'une telle réaction photochimique bien qu'une telle hypothèse paraisse fort plausible. Comme les ions manganèse absorbent dans l'ultraviolet, une étude plus approfondie du comportement de ceux de l'enzyme de dégradation de l'eau en présence des radiations UV est souhaitable.

Si une photoinactivation du complexe de PSII liée à une action ionisante des radiations UV sur les atomes de Mn semble difficile à concevoir dans nos conditions expérimentales, *qu'en est-il des ligands de ce complexe de dégradation de l'eau?*

Il a déjà été prouvé que la présence des ions chlorures (Cl^-) et calcium (Ca^{2+}) est nécessaire pour assurer l'activité de dégagement d'oxygène [Ghanotakis et coll. (1984), Damoder et coll. (1986), Shen et coll. (1988), Waggoner et coll. (1989), Debus (1992)]. De plus, Gregory a rapporté en 1989 que l'absence des ions Cl^- bloque le cycle d'oxydation de l'eau au niveau de l'état d'oxydation S_2 . À la lumière de ces connaissances, la photoinhibition de l'activité de dégagement des particules de PSII traitées aux ultraviolets pourrait être en partie imputée à la perte par l'enzyme de dégradation de l'eau de ses ligands Cl^- et Ca^{2+} . Cela peut s'expliquer si l'absorption du rayonnement ultraviolet par le centre de Mn occasionne une rupture des liaisons Mn-Cl et Mn-O-Ca (**effet inductif renforcé**), ou une modification de l'environnement polypeptidique du CMn entraînant par la même occasion le déplacement des ions Cl^- et Ca^{2+} de leurs sites de fixation.

Outre les ions Cl^- et Ca^{2+} , nous pourrions envisager une implication non moindre du radical d'histidine-190 (His-190) dans le processus de photoinactivation des fragments membranaires de PSII. Selon Debus (1992) et Tang et coll. (1994), l'absence de His-190 sur le côté lumenal de la protéine D1 résulte en la perte de l'activité de dégagement d'oxygène. Comme il n'y a pas d'autre radical essentiel d'histidine sur la face lumenale de la

protéine D1, Tang et coll. (1994) conclurent que c'est probablement celui qui fait partie des ligands de coordination du CMn. Nous avons mentionné ci-dessus qu'au cours de l'irradiation des particules de PSII avec la lumière UV, il se produit à la fois de la photoinhibition (majeure) et de la photosynthèse (mineure). Vu que le PSII utilise l'eau comme substrat pour la production des molécules de O₂ au cours de la photosynthèse, les radicaux d'acides aminés et les pigments voisins du centre de Mn deviennent alors exposés à un risque permanent d'oxydation à cause des donneurs d'électrons P680 et TyrZ (Tyr-161) qui sont caractérisés par un potentiel rédox positif d'environ +1 V [Dau (1994)]. Donc, dans une telle situation une illumination des complexes de PSII même avec de faibles intensités de radiations UV contribuerait à accélérer directement ou indirectement l'oxydation de His-190. Une photodégradation de His-190 engendrée par son excitation directe à 204, 226 et 280 nm demeure difficile à concevoir à cause du maximum d'absorption qui se trouve dans la région de 211 nm [Smith (1989)]. Cependant, étant donné que le pH de la solution d'incubation (BTS400) est de 6.5 (voisinage du pH neutre), il devient probable que His-190 soit oxydée indirectement par l'oxygène singulet (*cas discuté plus loin*) ou par transfert d'énergie des atomes de Mn vers ce motif d'acide aminé. La photo-oxydation indirecte ou directe du radical de His-190 va contribuer probablement à l'accroissement de la charge positive globale sur le complexe de Mn. Ainsi, nous assisterons à une augmentation de l'énergie libre de transfert d'électrons (ΔG^0) du CMn vers la TyrZ⁺ [Brettel et coll. (1984)] dont la conséquence sera la diminution de la capacité fonctionnelle (**vitesse de transport d'électrons**) du PSII. Cette argumentation s'appuie aussi sur le travail de Debus (1992) qui, en se basant sur des considérations électrostatiques, rapporte que la vitesse de transfert d'électrons de Mn à TyrZ⁺ décroît avec l'augmentation du nombre d'équivalents d'oxydation dans le complexe de dégagement d'oxygène. En poussant plus loin notre investigation, nous pouvons aussi voir l'implication du radical de His-190 dans le processus de photoinactivation sous forme de changement d'orientation

spatiale, c'est-à-dire de modification de la distance et d'angle entre la protéine D1 et le CMn. En effet, selon le modèle de la **figure 21** [Vermaas et coll. (1993)], le radical de His-190 est situé à proximité de la TyrZ du polypeptide D1. Lorsque les particules de PSII sont exposées à une illumination UV continue, un changement conformationnel s'opère au niveau de l'enzyme de dégradation de l'eau (présence de liaison peptidique et sans doute d'acides aminés aromatiques) entraînant la modification de la position de stabilité thermodynamique de His-190 par rapport à la Tyr-161. Le transfert d'électrons du CMn vers la TyrZ⁺ deviendrait alors inefficace.

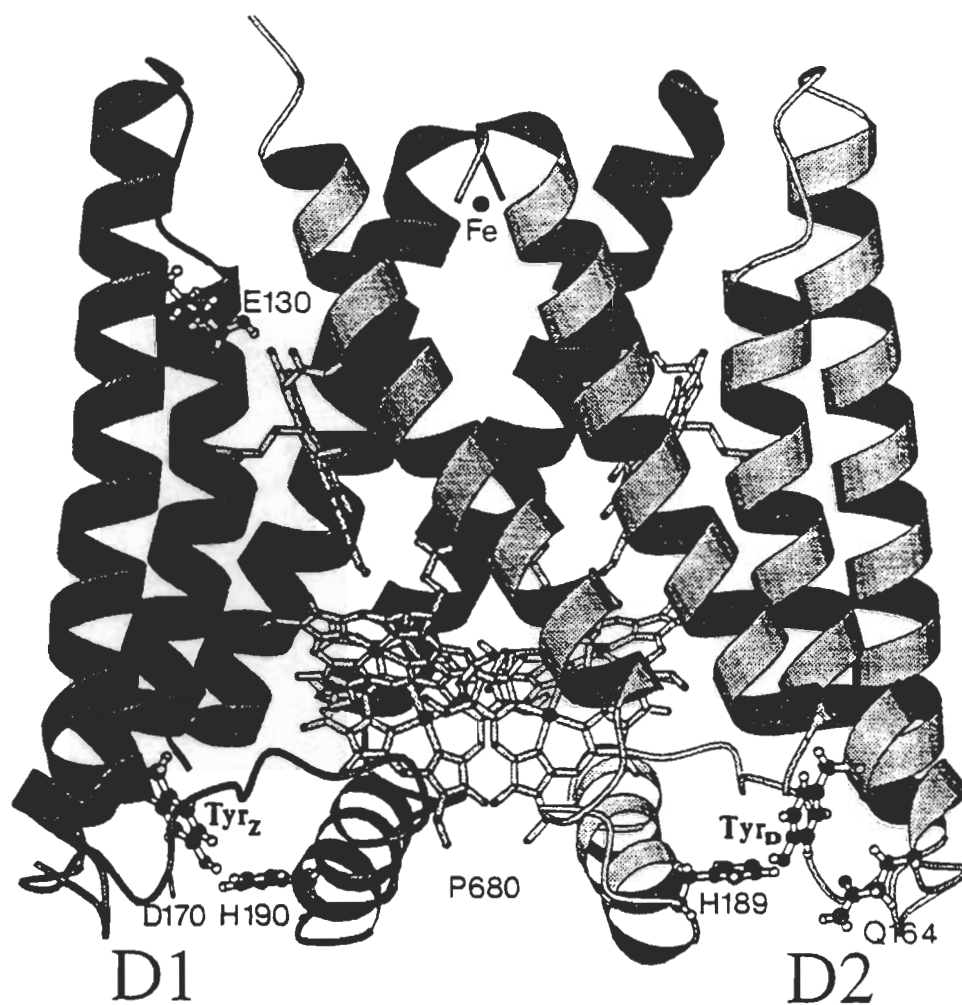


Figure 21. Modèle de la structure du centre réactionnel du photosystème II [Vermaas et coll. (1993)].

Outre le centre de Mn, la TyrZ se présente comme la cible privilégiée des radiations UV à cause de ses caractéristiques en spectroscopie électronique et de la position stratégique qu'elle occupe dans la chaîne de transport d'électrons (voir **figure 4** au **Chapitre I**). Des études faites en dichroïsme circulaire ont permis à Sreerama et coll. (1998) de mettre en évidence les transitions d'état fondamental $L_a(\perp)$, $L_b(//)$, $B_a(\perp)$, $B_b(//)$ de la chaîne latérale de la tyrosine. Ces transitions, qui ont aussi été identifiées par Dodonova (1993) et Smith (1989), s'observent respectivement à 278, 229, 193 et 192 nm.

Bien que tous les radicaux de tyrosine impliqués dans les séquences d'acides aminés des polypeptides présentent les mêmes propriétés physico-chimiques vis-à-vis des photons UV, nous préférons discuter du cas particulier de la TyrZ à cause de son rôle d'intermédiaire de transport d'électrons. Donc, à partir des informations données ci-dessus, nous envisageons qu'au cours de l'irradiation des complexes de PSII, il pourrait y avoir une interaction directe du noyau benzénique de la TyrZ (**chaîne latérale**) avec les photons UV à toutes les longueurs d'onde utilisées dans ce travail. Cela pourrait conduire probablement à une modification de sa structure chimique dont la conséquence serait une accumulation de charges positives ($P680^+$) dans le centre réactionnel et aussi un nombre accru d'électrons aqueux dans le système, diminuant ainsi la capacité fonctionnelle du PSII.

Nous avons jusqu'à ce niveau tenté d'interpréter la photoinactivation des particules PSII comme la conséquence d'une photodégradation résultant d'une photoexcitation directe des intermédiaires de transfert d'électrons par les photons UV à 280, 226 et 204 nm. Mais en vertu du grand nombre de chromophores qu'on retrouve dans le PSII, l'irradiation de ce dernier avec de faibles intensités de la lumière UV peut engendrer plusieurs mécanismes réactionnels très complexes capables de contribuer à son inactivation.

IV.2.5. Autres effets du rayonnement UV dans la photoinactivation du PSII

Nous avons discuté ci-dessus du rôle des désactivateurs ou pièges à excitons dans le processus d'inactivation des complexes de PSII. À la suite de Renger et coll. (1991) et Okada et coll. (1976), nous pensons que l'absorption de la radiation UV (280-400 nm) peut provoquer la formation de ces désactivateurs supplémentaires d'excitons dans le PSII, particulièrement dans le centre réactionnel. Ces pièges à excitons seraient probablement des agrégats de pigments chlorophylliens dont la formation provoquerait une désorganisation du centre photochimique, voire une modification l'espace entre les molécules. Il en résulterait un affaiblissement du champ électrique qui ne serait plus en mesure d'assumer efficacement la séparation de charges entre la P680* et la Phé. Notre argumentation s'appuie sur les travaux de Foyer (1984) qui avait montré que les molécules de pigments photosynthétiques dans le PSII sont orientées les unes par rapport aux autres de manière à permettre une transmission efficace de l'énergie d'excitation. Ainsi, la distance qui sépare deux molécules de chlorophylle adjacentes ne peut pas être plus petite que 10 Å et ne peut non plus excéder 70 Å.

Outre l'effet de ces pièges ou désactivateurs à excitons, la présence de certains agents toxiques tels le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), les radicaux libres hydroxyls (OH^\bullet) et superoxydes d'oxygène ($\text{O}_2^{\bullet-}$) apparaît comme une voie possible pour expliquer la photoinactivation des particules de PSII. Ces agents sont générés à partir de processus moléculaires divers. Par exemple, Craggs et coll. (1993) ont étudié l'inactivation du phage T7 en l'irradiant avec une intensité de $58.3 \text{ J.s}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$ de lumière UV (280-400 nm) en présence de 1 mM de tryptophane, de tyrosine et de phénylalanine. Soulignons que l'inactivation du phage T7 a lieu uniquement lorsque ces trois acides aminés aromatiques sont ajoutés au système avant le traitement aux ultraviolets. La présence de la tyrosine et de la phénylalanine conduit à la production des radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$. L'ensemble $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 est

pour les protéines du PSII et spécifiquement pour l'enzyme de dégradation de l'eau dont l'extrême vulnérabilité a été évoquée par Dau en 1994. En effet, $^1\text{O}_2$ peut provenir de diverses sources. Par exemple, la ^3Chl ou la $^3\text{P680}^*$ produit du $^1\text{O}_2$ en réagissant rapidement avec les molécules de $^3\text{O}_2$ [Macpherson et coll. (1993), Lidon and Henriques (1993)]. Aussi, $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut conduire à la formation de H_2O_2 et $^1\text{O}_2$ en réagissant avec des protons dans la solution. Les molécules de $^1\text{O}_2$ générées peuvent à leur tour interagir avec la liaison peptidique, les ponts S-S ou les radicaux de certains acides aminés comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine [Mistoki et Garcia, Michaeli et Feitelson (1995)]. Cela pourrait sans doute conduire à un affaiblissement du squelette des protéines ou à une dénaturation de leur structure secondaire. L'action inhibitrice des radicaux hydroxyles (OH^\bullet) hautement dommageables pour les systèmes biologiques pourrait être aussi envisageable dans la mesure où ils peuvent être produits à partir d'une interaction du H_2O_2 avec certains ions métalliques du PSII. Ces espèces chimiques réactives peuvent aussi oxyder les chaînes acyles des lipides du PSII [Bose et Chatterjee (1994), Kohen et coll. (1995)], affaiblissant la ceinture autour du complexe de PSII, et par voie de conséquence les liens entre les diverses composantes moléculaires.

Un dernier point à noter est que des radicaux d'acides aminés oxydés directement ou indirectement lors de l'irradiation des particules de PSII avec la lumière UV peuvent aussi constituer des pièges à électrons. Par exemple, au cours de l'irradiation des complexes de PSII avec de la lumière UV, les radicaux de tyrosine-161 peuvent être oxydés par transfert d'électrons intramoléculaire (généralement vu dans les protéines) d'une TyrZ à une tryptophane photo-oxydée [Kohen et coll. (1995)]. À cause de ce déficit électronique, la TyrZ^+ ne pourrait pas réduire la P680^+ formée au cours de l'activité de transfert d'électrons en présence de la lumière visible. Ainsi, la séquence réactionnelle CMn-TyrZ-P680⁺ serait bloquée à cause de l'accumulation de charges positives entre le CR-PSII et le côté donneur.

CHAPITRE V

EFFETS DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET

SUR LE PHOTOSYSTÈME II:

ASPECT STRUCTURAL

V.1. Résultats

Au chapitre précédent, la photo-inhibition a été interprétée en tenant en considération l'effet du rayonnement UV sur le fonctionnement du PSII, plus spécifiquement sur le dégagement d'oxygène et le transport d'électrons. Cependant, il reste à établir une relation entre l'ampleur des changements induits au niveau des différentes composantes moléculaires et la perte de l'intégrité fonctionnelle du PSII. Pour ce faire, nous utilisons deux indicateurs qui sont sensibles aux effets de la lumière UV, à savoir la variation en absorbance des pigments photosynthétiques et la perte en protéines. Ainsi, à travers cette partie de notre travail, nous allons évaluer l'étendue de l'action du rayonnement UV sur les principaux pigments photosynthétiques et les protéines majeures du PSII grâce aux mesures effectuées par électrophorèse ainsi qu'en spectroscopie électronique et infrarouge. À travers cette démarche, nous tenterons de répondre à la question d'ordre mécanistique relative à la localisation des lésions causées par les radiations UV dans le complexe de PSII. Chaque mesure de caractérisation des effets des radiations UV sera précédée d'une vérification de l'intégrité structurelle des fragments membranaires de PSII non irradié.

V.1.1. Effet du rayonnement UV sur les pigments photosynthétiques

La **figure 22** présente les spectres d'absorption (A) et de dérivée seconde (D) du PSII natif dont l'ADO est $355 \mu\text{moles O}_2.\text{mg}^{-1}\text{Chl.h}^{-1}$. La seconde dérivée du spectre

d'absorption montre en détails des minima (bandes négatives) à 384, 414, 438, 470, 490, 546, 572, 592, 624, 650 et 677 nm. Ils sont caractéristiques de l'absorption des pigments photosynthétiques majeurs du PSII. Comme vous le verrez ci-dessous, ces transitions électroniques ont déjà été identifiées par plusieurs groupes de recherche.

(i) La bande à 677 nm est un mélange des transitions $Q_Y(0,0)$ dans la Chl a et la Phé a [Fragata et coll. (1988), Nordén et coll. (1992), Demeter et coll. (1987), Iwaki et coll. (1992)].

(ii) La bande à 650 nm correspond principalement à la transition $Q_Y(0,0)$ dans la Chl b, mais contient aussi quelque transition $Q_X(1,0)$ de la Chl a [Nordén et coll. (1992)].

(iii) Les bandes à 624 et 592 nm sont attribuées respectivement aux transitions $Q_X(1,0)$ et $Q_X(3,0)$ dans la Chl a [Nordén et coll. (1992)].

(iv) La bande à 572 nm est partiellement due au cycle tétrapyrrolique du hème dans le Cyt_b559 [Vermeglio et coll. (1980)].

(v) La très faible bande à 546 nm, difficilement perceptible dans notre spectre, représente la transition $Q_X(0,0)$ dans la Phé [Fragata et coll. (1988), Nordén et coll. (1992), Klimov et coll. (1978), Macpherson et coll. (1993)]. Cette transition s'observe à 535 nm dans les travaux d'Eijkelhoff et Dekker (1995) ainsi que de Montoya et coll. (1991). Selon ces auteurs, il y a aussi une certaine contribution de la Chl et de la β -Car.

(vi) Les bandes à environ 470 et 490 nm sont dues à l'absorption de la β -carotène [Macpherson et coll. (1993)].

(vii) La bande à 438 nm est due à une absorption polarisée-X de la Chl a [Fragata et coll. (1988)].

(viii) À 384 et 414 nm, nous observons un mélange des bandes d'absorption de Chl et de Phé [Klimov et coll. (1988)]. Cependant, Kobayashi et coll. (1990) et Gounaris et coll. (1990) ont observé aussi une participation de la β -Car au niveau de la bande d'absorption centrée à 414 nm.

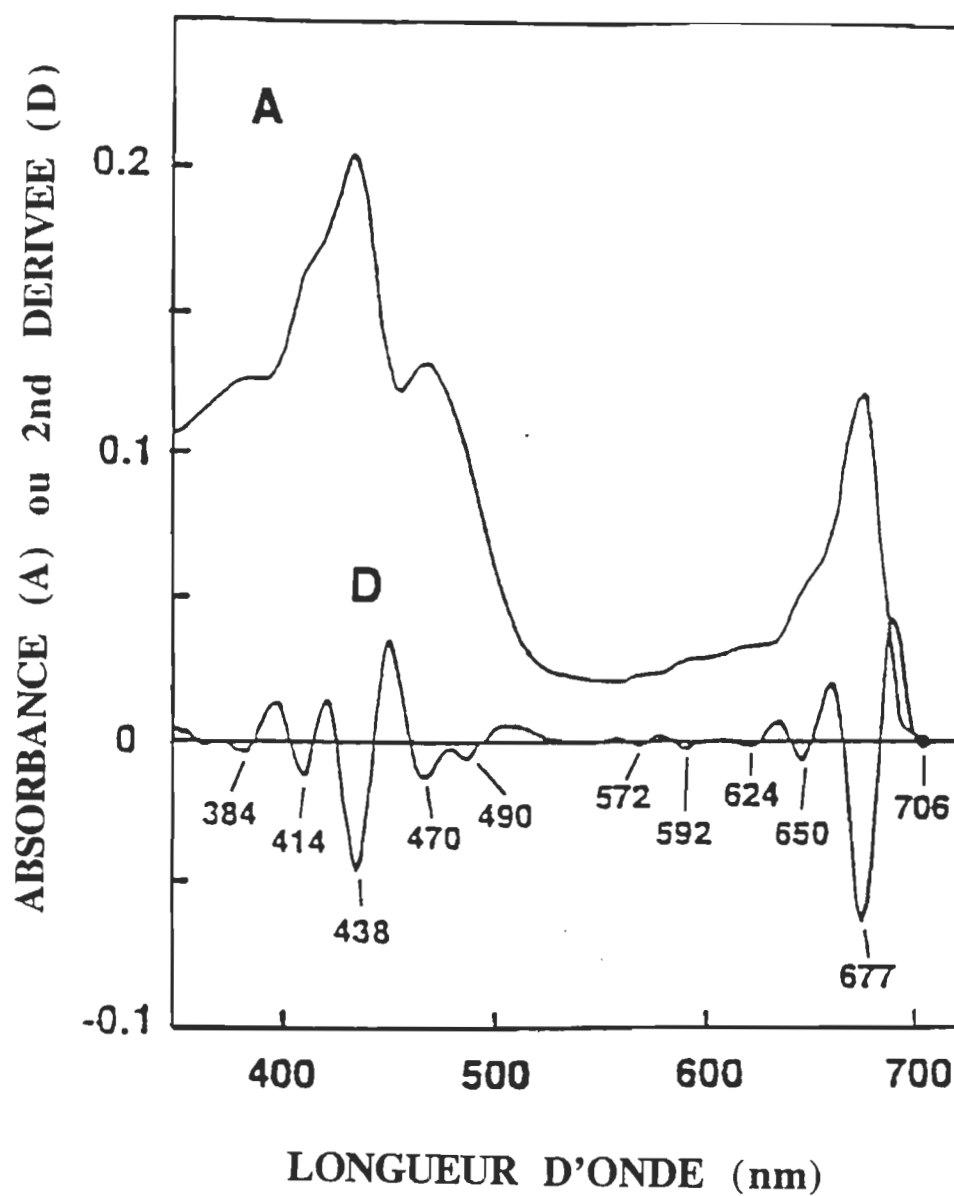


Figure 22. A) Spectre d'absorption des particules de PSII natif incubées dans la solution BTS400, D) dérivée seconde du spectre d'absorption [Ségui et Fragata (1990)].

L'effet de la radiation à 280 nm d'une intensité incidente de 2.0 W.m^{-2} sur les pigments photosynthétiques du PSII est mise en évidence à la **figure 23b**. Ce spectre de différence d'absorption (ΔA) est obtenu selon l'expression mathématique

$$\Delta A = A_i(90) - A_{ni}(0) \quad (6)$$

où $A_{ni}(0)$ et $A_i(90)$ sont respectivement les absorbances pour des durées d'irradiation UV de 0 et 90 min. Les indices i et ni indiquent respectivement les échantillons de fragments membranaires de PSII irradiés et non irradiés.

Le fait que le spectre de la **figure 23b** soit négatif (voir facteur de multiplication de -10) tend à prouver que les radiations UV ont provoqué une diminution d'absorbance au niveau des complexes de PSII photo-oxydés. Cela constitue une indication de la photomodification, voire de photoblanchiment des pigments photosynthétiques majeurs du PSII. Nous remarquons que la différence spectrale suit approximativement le profil du spectre d'absorption du PSII natif. Aussi, le facteur de multiplication de 10 montre que l'amplitude de photoblanchiment demeure faible après 90 min d'irradiation avec de la lumière UV à 280 nm.

Pour une investigation plus détaillée des effets des radiations UV sur les pigments, nous avons déterminé la différence relative (\emptyset^r) des spectres d'absorption à partir de l'équation

$$\emptyset^r = (A_{90} - A_0) / A_0 \quad (7)$$

où, comme précédemment, A_0 et A_{90} représentent les absorbances du PSII au début et à la fin de l'illumination. Ces spectres de différence relative sont présentés à la **figure 24**.

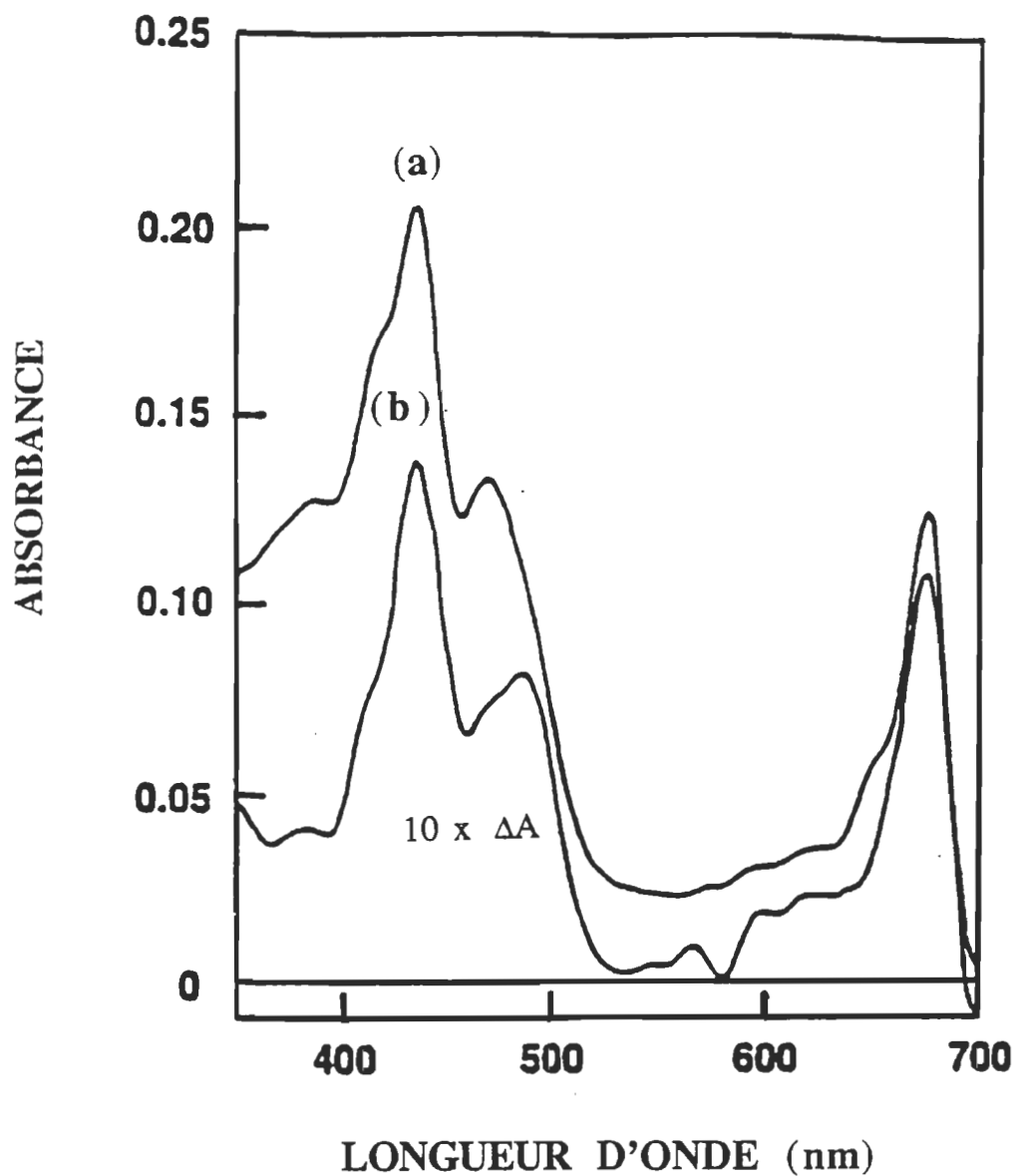


Figure 23. a) Spectre d'absorption des particules de PSII natif incubées dans la solution BTS400 à $T = 273$ K sous courant de N_2 . b) Différence de spectres d'absorption [$10 \times (\Delta A)$] obtenue après 90 min d'irradiation à 280 nm avec une $I_{inc} = 2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ [Ségui et Fragata (1994)].

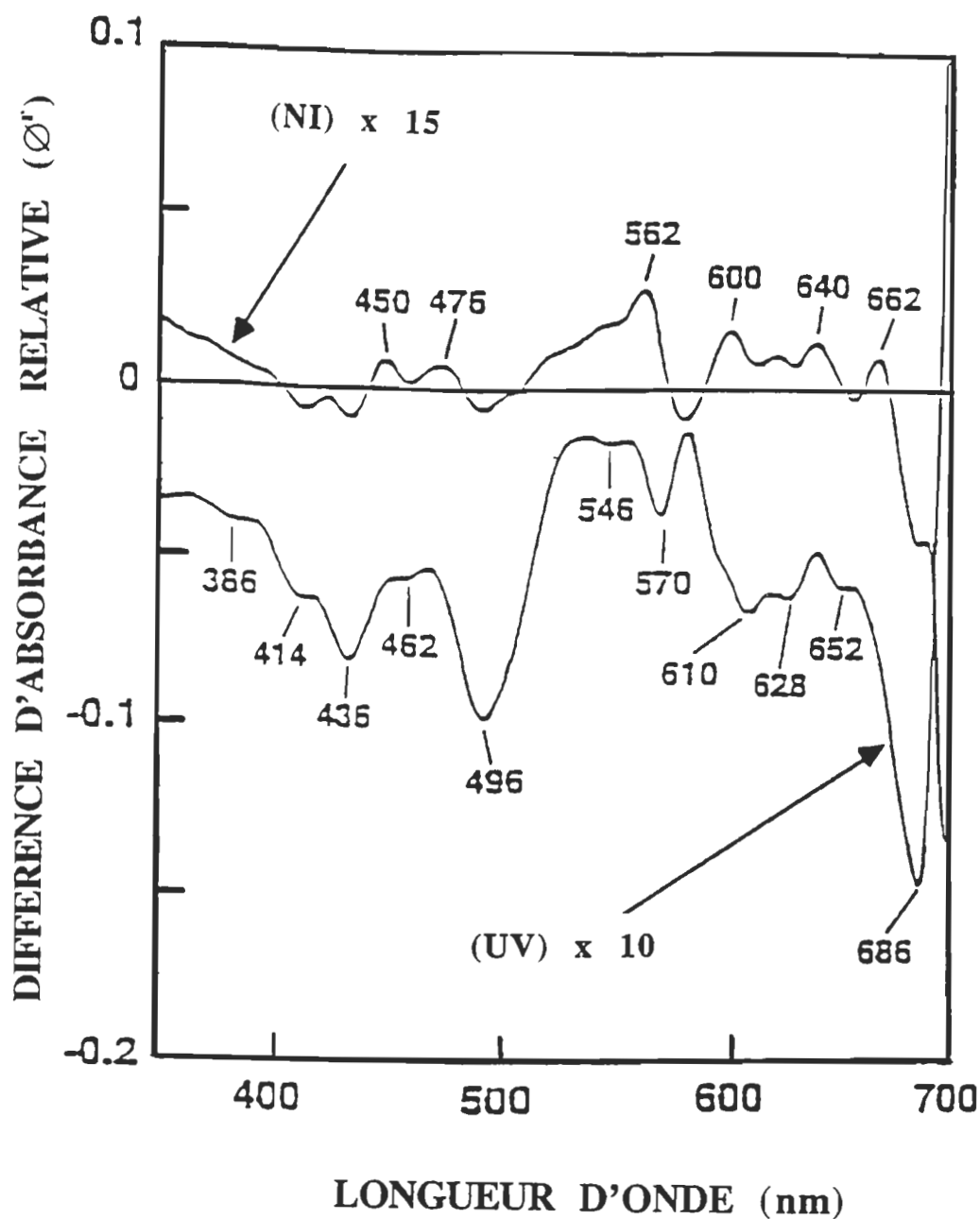


Figure 24. Perte relative d'absorbance des particules de PSII non irradiées (NI) et exposées à la radiation UV à 280 nm avec une $I_{inc} = 2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Les particules sont incubées dans la solution de BTS400 à $T \approx 276 \text{ K}$, sous courant de N_2 .

Nous notons aussi qu'après 90 min d'incubation, les préparations contrôle de PSII montrent des signes d'altération. Le patron spectral (**figure 24**: NI) faisant état de ce phénomène paraît différent de celui qui est observé dans le cas des particules traitées aux radiations UV (**figure 24**: UV). Cette diminution d'absorbance est toutefois très faible par rapport au photoblanchiment comme l'indique le facteur de multiplication 15. La perte relative d'absorbance observée au niveau des échantillons contrôle serait probablement liée au vieillissement des particules. Il faudrait souligner que contrairement à la différence de spectres de PSII exposé à la lumière UV, celle qui met en évidence le phénomène d'obscurité est dominée par des bandes positives. Il est connu que le PSII isolé est dépourvu de mécanisme de synthèse de pigments photosynthétiques. Alors, ces bandes positives proviendraient tout simplement des complexes formés à partir des interactions pigment-pigments (présence de liaisons hydrogènes).

L'action spécifique du rayonnement UV sur les pigments photosynthétiques envisagée quantitativement sous forme de perte d'absorbance relative (PA) conduit à l'obtention des **tableaux 4 et 5**. Ces résultats sont corrigés par rapport aux contrôles. Nous remarquons qu'après 45 min d'illumination des fragments membranaires de PSII à 280 nm ($2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$), les intensités des bandes d'absorption des chromophores subissent une diminution significative. Par contre, pour un flux de photons incidents de $0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ et la même durée d'irradiation, il n'y a pratiquement pas de baisse d'absorbance à 226 et 204 nm. Par ailleurs, ce n'est qu'en doublant le temps d'exposition que nous observons une baisse infime des intensités des pics d'absorption à ces deux longueurs d'onde (voir **tableau 5**). Ce photoblanchiment quasi négligeable observé à 226 et 204 nm après 90 min d'irradiation s'expliquerait par le fait que les pigments photosynthétiques absorbent très peu à ces longueurs d'onde.

Tableau 4. Effets des radiations UV (280, 226 et 204 nm) sur les pigments photosynthétiques majeurs du PSII après 45 min d'irradiation. Ces résultats représentent la moyenne de 23 expériences.

Pourcentage de perte en absorbance de pigments photosynthétiques			
Longueurs d'onde d'absorption	280 nm	226 nm	204 nm
677	5.18 \pm 0.22	0.00	0.00
650	2.49 \pm 0.01	0.00	0.00
546	1.27 \pm 0.01	0.00	0.00
470	5.17 \pm 0.23	0.00	0.00

Tableau 5. Effets des radiations UV (280, 226 et 204 nm) sur les pigments photosynthétiques majeurs du PSII après 90 min d'irradiation. Ces résultats représentent la moyenne de 17 expériences.

Pourcentage de perte en absorbance de pigments photosynthétiques			
Longueurs d'onde d'absorption	280 nm	226 nm	204 nm
677	10.30 \pm 0.16	1.40 \pm 0.02	0.20 \pm 0.01
650	3.98 \pm 0.10	0.50 \pm 0.01	0.00
546	1.99 \pm 0.08	0.10 \pm 0.02	0.00
470	7.48 \pm 0.14	0.99 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01

Le **tableau 5** nous permet de constater facilement que le photoblanchiment des pigments s'accroît avec le prolongement de la durée d'exposition des fragments membranaires au rayonnement UV. Cela s'observe aisément au niveau de la bande d'absorption apparaissant à 677 nm. Après 90 min d'irradiation, la perte en absorbance estimée à cette longueur est plus importante que celle enregistrée après 45 min. Aussi, en vue de comparer la sensibilité des pigments photosynthétiques au rayonnement UV à 280 nm, nous avons déterminé les rapports d'intensités des bandes caractéristiques de l'absorption de la Chl a (677 nm), Chl b (650 nm), la Phé (546 nm) et de la β -carotène (470 nm). Ces rapports $A_{\text{Chl } a} / A_{\text{Chl } b}$, $A_{\text{Chl } a} / A_{\text{Phé}}$ et $A_{\text{Chl } a} / A_{\beta\text{-Car}}$ passent respectivement de 0.98, 0.96, 1.00 à 0.94, 0.91, 0.98 après 90 min d'irradiation. Bien que ces variations soient faibles, nous croyons que ces rapports continueront de diminuer au fur et à mesure que l'on prolongera l'irradiation des échantillons. Ces résultats montrent que la photodégradation de la Chl a est plus rapide que celle de la Phé et de la Chl b. Seuls les caroténoïdes (β -Car) semblent subir un photoblanchiment au même rythme que la Chl a, car la durée d'irradiation n'influence pas le rapport $A_{\text{Chl } a} / A_{\beta\text{-Car}}$. À partir de cette observation, nous attribuons raisonnablement la baisse constatée au niveau de la bande à 677 nm (mélange des transitions Qx (0, 0) de Chl a et de la Phé a) à la photodégradation de la Chl a. La raison pour laquelle ces pigments photosynthétiques (Chl a et β -Car) montrent une plus grande sensibilité au rayonnement UV n'est pas encore élucidée.

V.1.2. Caractérisation, à l'aide d'électrophorèse SDS-PAGE, de l'effet des rayons UV sur les polypeptides du PSII

Après l'étude de l'action du rayonnement UV sur les pigments photosynthétiques majeurs, voyons maintenant ce qui pourrait en être des polypeptides du PSII. La **figure 12 (Chapitre III)** présente le densitogramme d'un gel d'électrophorèse de fragments

membranaires de PSII sur lequel est indiqué la masse moléculaire des différents polypeptides. Le **tableau 6** présente les pourcentages de diminution de la teneur en protéine. Ces résultats proviennent de quatre mesures effectuées par électrophorèse sur des particules d'extractions différentes. La diminution de l'absorbance observée durant l'irradiation constitue probablement une indication de la photodégradation des protéines. Ces résultats nous permettent de constater une similarité entre les cinétiques de photoblanchiment subi par les pigments photosynthétiques et de photodégradation des protéines à 280 nm. La baisse d'intensité des bandes d'absorption étant à peine perceptible après 45 min d'exposition des échantillons aux radiations UV ($2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$), nous avons alors choisi de ne présenter que les résultats obtenus après 90 min d'irradiation continue. Par ailleurs, après 90 min d'irradiation, aucune modification quantifiable n'a été notée au niveau des pics d'absorption des protéines de PSII exposé à la lumière UV à 226 et 204 nm pour $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Les calculs sont effectués en normalisant les intensités des bandes d'absorption de chaque protéine avec celle de la 29 kDa (protéine de l'antenne distale) qui demeure in affectée. Pour la mise en évidence des effets des radiations UV, nous avons choisi de considérer quelques polypeptides indispensables au maintien de l'intégrité fonctionnelle du PSII. Ce sont entre autres les polypeptides de l'antenne proximale (47 et 43 kDa), de l'unité minimale du centre réactionnel (D1: 32 kDa et D2: 34 kDa) et les polypeptides extrinsèques de 16, 23 et 33 kDa. D'une façon générale, ces résultats prouvent que tous les polypeptides majeurs du PSII peuvent subir des dommages à des degrés divers sous l'action du rayonnement UV. Nous notons qu'après 90 min d'irradiation à 280 nm, les bandes d'absorption caractéristiques des protéines de 47 et 43 kDa perdent respectivement environ 4.3 et 3.3 % de leur intensité. L'ordre de grandeur de ces valeurs suggère que les protéines de l'antenne proximale se détériorent de façon uniforme. Ce phénomène pourrait être dû au fait que ces deux polypeptides contiendraient probablement le même nombre de radicaux d'acides aminés aromatiques, en l'occurrence la tyrosine et le

tryptophane. Aussi, nous remarquons que de toutes les protéines, la D2 et celle de 16 kDa montrent une plus grande sensibilité au rayonnement UV. Cette sensibilité se traduit par une baisse d'environ 11.4 % et 9.4 % des intensités de leurs pics respectifs d'absorption. De plus, la perte d'intensité du pic d'absorption de la protéine D2 (11.4 %) est environ deux fois plus rapide que celle de D1 (5.8 %). Cela prouve que dans nos conditions expérimentales, la protéine D1 montre une plus forte résistance vis-à-vis des photons UV à 280 nm que la D2 contrairement à ce qui a été rapporté par Frisco et coll. (1993, 1994, 1995), Greenberg et coll. (1989) ainsi que par Barbato et coll. (1995). Leurs résultats n'infirment pas forcément les nôtres parce que ces auteurs ont travaillé avec des membranes de thylacoïdes ou des feuilles entières dans le domaine de l'UV-B (320-280 nm) en utilisant des filtres dont le maximum de transmission se trouve autour de 312 nm. Enfin, nous notons que les trois protéines extrinsèques montrent apparemment des sensibilités différentes à ce rayonnement UV. Outre la protéine de 16 kDa, celles de 33 et 23 kDa perdent environ 4.4 et 1.6 % de leur teneur respective après 90 min d'irradiation. En comparaison des deux autres protéines extrinsèques de 33 et 16 kDa, celle de 23 kDa n'est pratiquement pas affectée par la radiation UV à 280 nm. Les raisons de ce phénomène ne sont pas encore claires parce que jusqu'à ce jour, l'action du rayonnement UV sur les protéines extrinsèques du PSII n'a jamais fait l'objet d'études spécifiques.

Tableau 6. Effet de la radiation UV à 280 nm sur quelques protéines majeures du PSII [Ségui et Fragata (1994)]. Ces résultats constituent une moyenne de 4 expériences faites par électrophorèse.

Sous-unités de PSII	Masse Moléculaire (kDa)	Perte en absorbance de protéines colorées (%)
Antenne proximale	47	4.30 ± 0.62
	43	3.31 ± 0.48
CR-PSII	34 (D2)	11.39 ± 0.94
	32 (D1)	5.78 ± 0.65
Protéines extrinsèques	33	4.37 ± 0.44
	23	1.59 ± 0.33
	16	9.40 ± 0.67

V.1.3. Étude, à l'aide de la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier, de l'effet des rayons UV

Nous venons de voir d'après nos analyses par électrophorèse et en spectroscopie UV-visible que les photomodifications induites par les radiations UV (surtout à 226 et 204 nm) dans le PSII sont de très faible amplitude comparativement à l'ampleur de la photo-inhibition de l'activité de transfert d'électrons mesurée après 45 min d'irradiation. La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (comme méthode alternative) dans le cadre de ce travail pourrait permettre de déceler des modifications structurales de très faible amplitude provoquées par les rayons UV dans le complexe de PSII. Elle présente l'avantage d'être très sensible, non sélective, car elle tient compte des vibrations actives de toutes les molécules dans le PSII. De plus, le faisceau électromagnétique de mesure ne cause pas de photochimie ou d'altération des échantillons [Mäntele et coll. (1985)].

V.1.3.1. Théorie de la spectroscopie infrarouge et des modes vibrationnels de la liaison peptidique

Il semblera sans doute redondant à certains spectroscopistes de voir une introduction à la spectroscopie IR dans le cadre d'un tel travail. Cependant, dans un souci d'amener tout lecteur à mieux cerner notre analyse, nous avons jugé bon de faire au préalable un rappel sommaire de la théorie classique de la spectroscopie infrarouge (IR). Bien que la mécanique classique soit inadéquate pour décrire pleinement la spectroscopie IR, elle fournit néanmoins de l'information quantitative utile aussi bien qu'une image qualitative pertinente du phénomène. Cette spectroscopie dite vibrationnelle est basée sur l'étude des interactions entre la matière et le rayonnement électromagnétique infrarouge. Considérons les atomes à l'intérieur d'une molécule comme des masses qui sont reliées par des ressorts (liaisons chimiques). Le champ électrique E oscillant de la radiation interagit avec le

radiation interagit avec le moment dipolaire \mathbf{P} (aussi oscillant) de la molécule pour le transfert d'énergie lorsque la fréquence de la radiation coïncide avec celles de résonance de l'assemblage de masses et ressorts. Pour une molécule diatomique hétéronucléaire traitée comme un oscillateur harmonique (voir **figure 25**), l'expression de la fréquence de résonance (en cm^{-1}) est donnée par les équations [Chavanne et coll. (1987)]

$$\nu = (1 / 2\pi c) (\kappa / \mu)^{1/2} \quad (8)$$

$$\text{et} \quad \mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2) \quad (9)$$

où μ est la masse réduite, c la vitesse de la lumière et k est la constante de forces variables des ressorts (liaisons chimiques).

L'absorption d'une radiation infrarouge a pour effet de faire vibrer l'assemblage en modifiant les distances interatomiques et les angles de liaisons [Chavanne et coll. (1987), George et McIntyre (1987)]. C'est à partir des modes de vibration que l'on interprète un spectre IR. Les principaux modes de vibration rencontrés dans une molécule complexe sont ceux d'élongation ("stretching") ou de valence et de déformation ("bending"). La **figure 26** présente les modes de vibration caractéristiques d'une structure de type AXY.

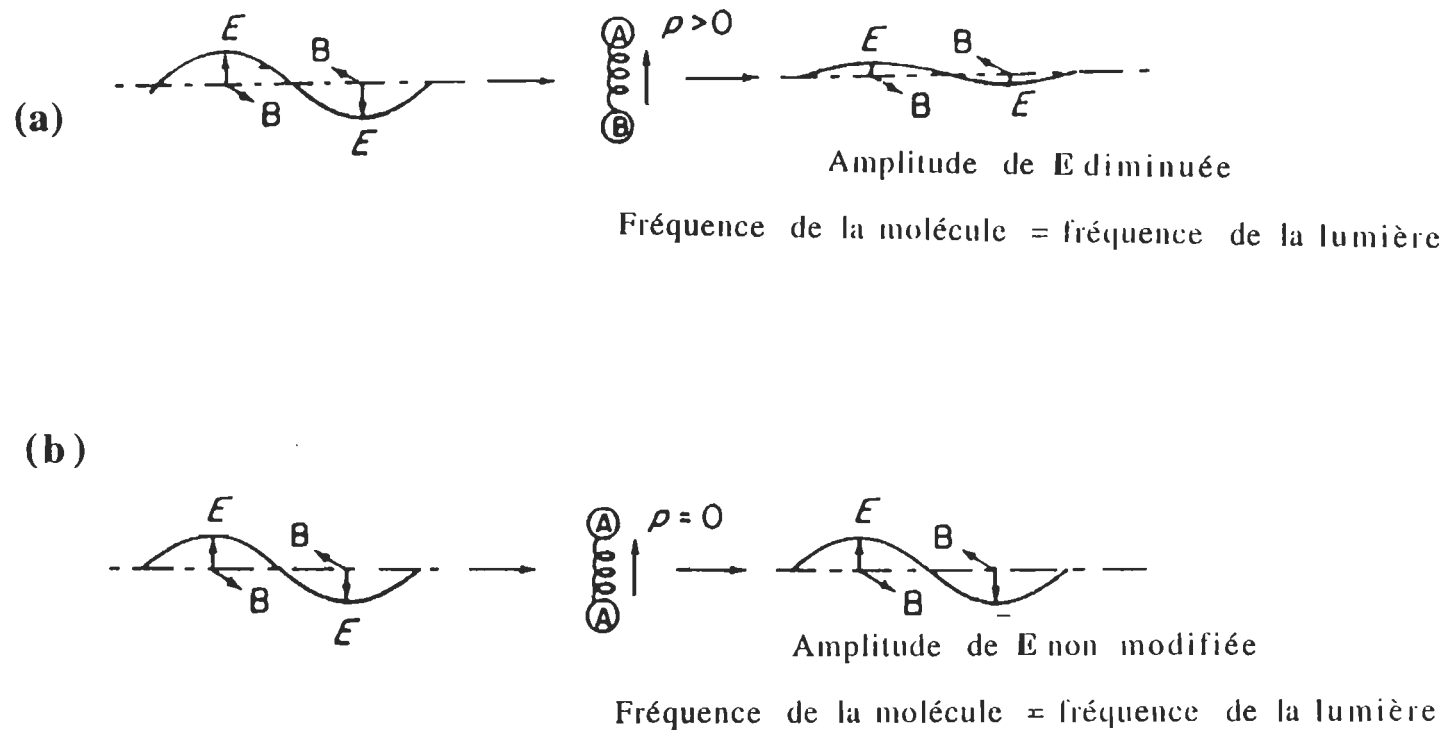
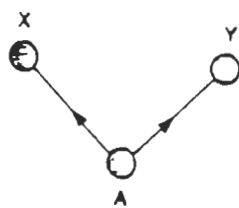
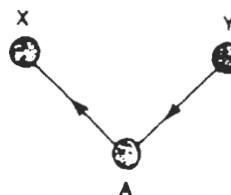


Figure 25. Modèle d'interaction de la radiation électromagnétique infrarouge avec une molécule diatomique: a) type A-B, b) type A-A. P représente le moment dipolaire de la molécule. B et E sont les composantes magnétique et électrique de la lumière IR [George et McIntyre (1987)].

Vibrations d'allongement

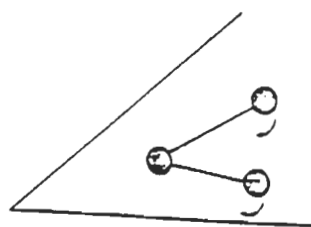


Symétrique

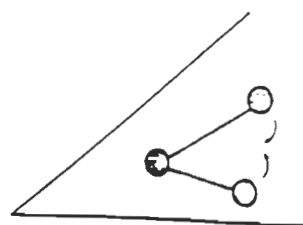


Asymétrique

Vibrations de déformation

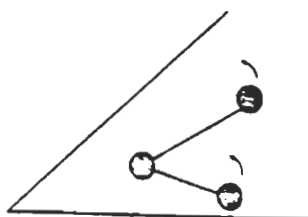


Rotation plane

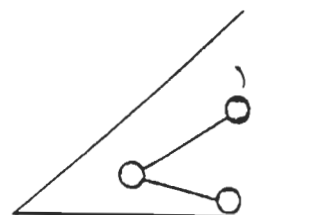


Cisaillement dans le plan

Déformation dans le plan



Balancement



Torsion

Déformation hors du plan

Figure 26. Modes de vibration dans l'infrarouge: représentation schématique d'un groupement triatomique covalent A, X, Y [Chavanne et coll. (1987)].

Les vibrations d'élongation sont caractérisées par des mouvements de rapprochement ou d'éloignement périodiques de deux atomes le long d'un axe commun. Elles sont symétriques (les atomes vibrent en phase) ou asymétriques (les atomes vibrent hors de phase). Les vibrations de déformation correspondent à une modification de l'angle de liaison. Il y a quatre vibrations possibles: deux dans le plan, les autres hors du plan. Les détails théoriques de la spectroscopie IR sont présentés dans Ferraro et Krishnan (1990), Mackenzie (1988), Chavanne et coll. (1987), Griffiths et Haseth (1986).

Lorsque l'on s'intéresse à l'étude IR du complexe du PSII, les modes de vibration majeurs sur lesquels se focalise généralement l'intérêt des chercheurs sont ceux des fonctions amides de la liaison peptidique. Ils sont présentés à la **figure 27** [Tu (1982)]. Tous les atomes impliqués dans cette liaison stabilisée par résonance sont coplanaires. Les plus importants modes de vibration considérés dans ce cas sont: l'amide I, l'amide II et l'amide III (faible). Les autres modes de vibration des fonctions amides d'ordre supérieur sont en général négligés.

L'amide I est principalement un mode d'élongation du groupement carbonyle C=O de la liaison peptidique [Dong et coll. (1990)]. Il reçoit quelques contributions de la part des modes d'élongation C-N et de déformation C α -C-N. Il se manifeste dans la région de 1700 à 1630 cm⁻¹ [Krimm et Bandekar (1986)]. D'autres études ont prouvé que la bande de la fonction amide I pourrait s'étendre de 1700 à 1600 cm⁻¹ [Brazhnikov et coll. (1978), Kossovsky et coll. (1994), Barnett et coll. (1996)].

L'amide II provient en grande partie de la combinaison des modes de déformation N-H dans le plan et d'élongation C-N. À cela s'ajoutent de petites contributions des modes de déformation C-O dans le plan et d'élongation C-C et N-C [Krimm et Bandekar (1986), Tu (1982)]. La bande représentant la fonction amide II est observée généralement à 1544 ± 5 cm⁻¹ [Mitchell et coll. (1988), Kossovsky et coll. (1994), Barnett et coll. (1996)].

L'amide III est largement due à la combinaison des modes de déformation N-H dans le plan et d'élongation C-N avec une petite contribution des modes d'élongation C-C et de déformation C-O dans le plan. La fonction amide III est rencontrée dans la région de 1310 à 1240 cm^{-1} [Krimm et Bandekar (1986), Tu (1982)].

Le mode d'élongation N-H en est un dit localisé. Cependant, il n'est pas aisé à analyser car il apparaît habituellement sous forme d'un doublet appelé amide A et amide B. L'autre composante interagissant est soit l'harmonique du mode de l'amide II ou la bande de combinaison. Cette bande a été reliée à la conformation de la protéine après une analyse de résonance de Fermi. En outre, les bandes amide A et amide B se rencontrent entre 4000 et 2700 cm^{-1} [Tu (1982)]. La description détaillée des modes de vibration caractérisant la fonction amide dans les protéines est donnée dans Tu (1982) ainsi que Krimm et Bandekar (1986).

L'analyse du mode de vibration de la fonction amide I a permis la caractérisation des différentes structures secondaires (hélices- α , feuillets- β , coudes- β , les structures non ordonnées) des protéines du PSII et d'autres complexes polypeptidiques non photosynthétiques. Des modèles de quelques structures secondaires sont présentés à la **figure 28**.

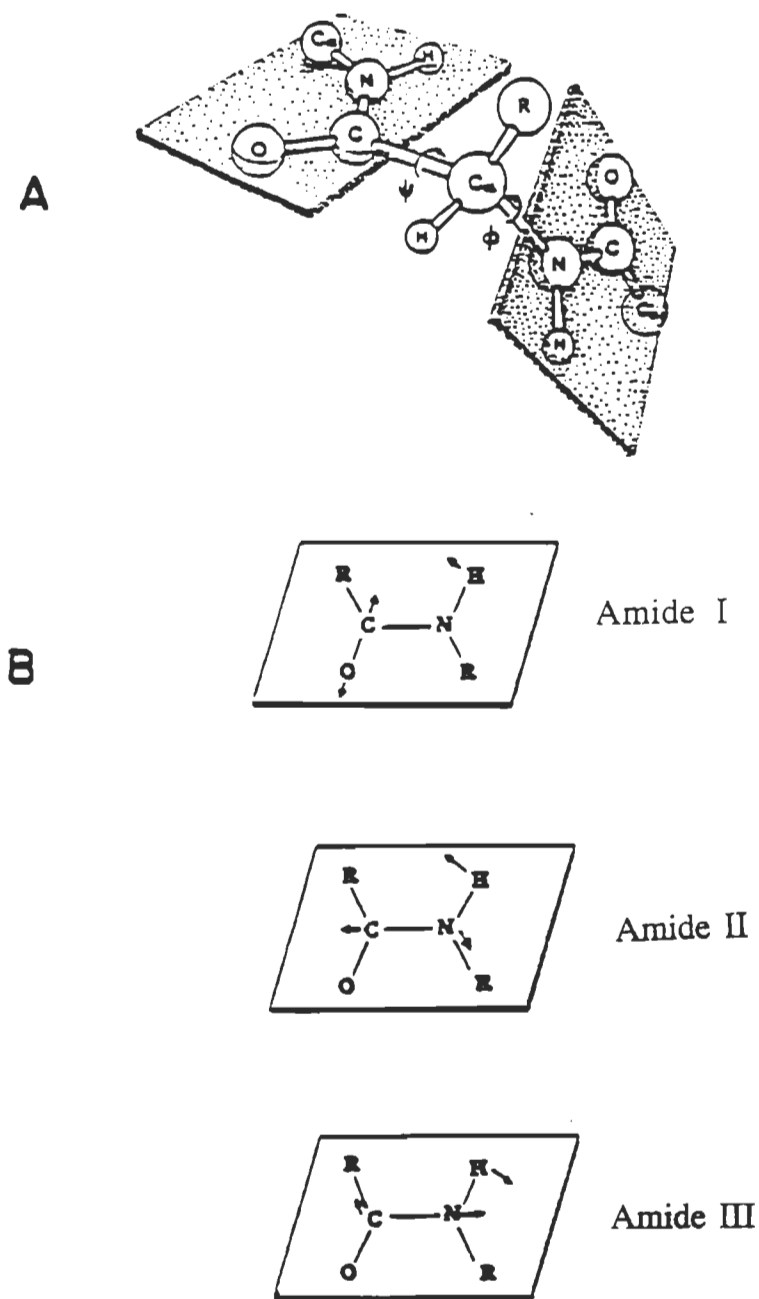


Figure 27. A) Structure et configuration de la liaison peptidique.
 B) Modes de vibration des fonctions amides
 [Tu (1982)].

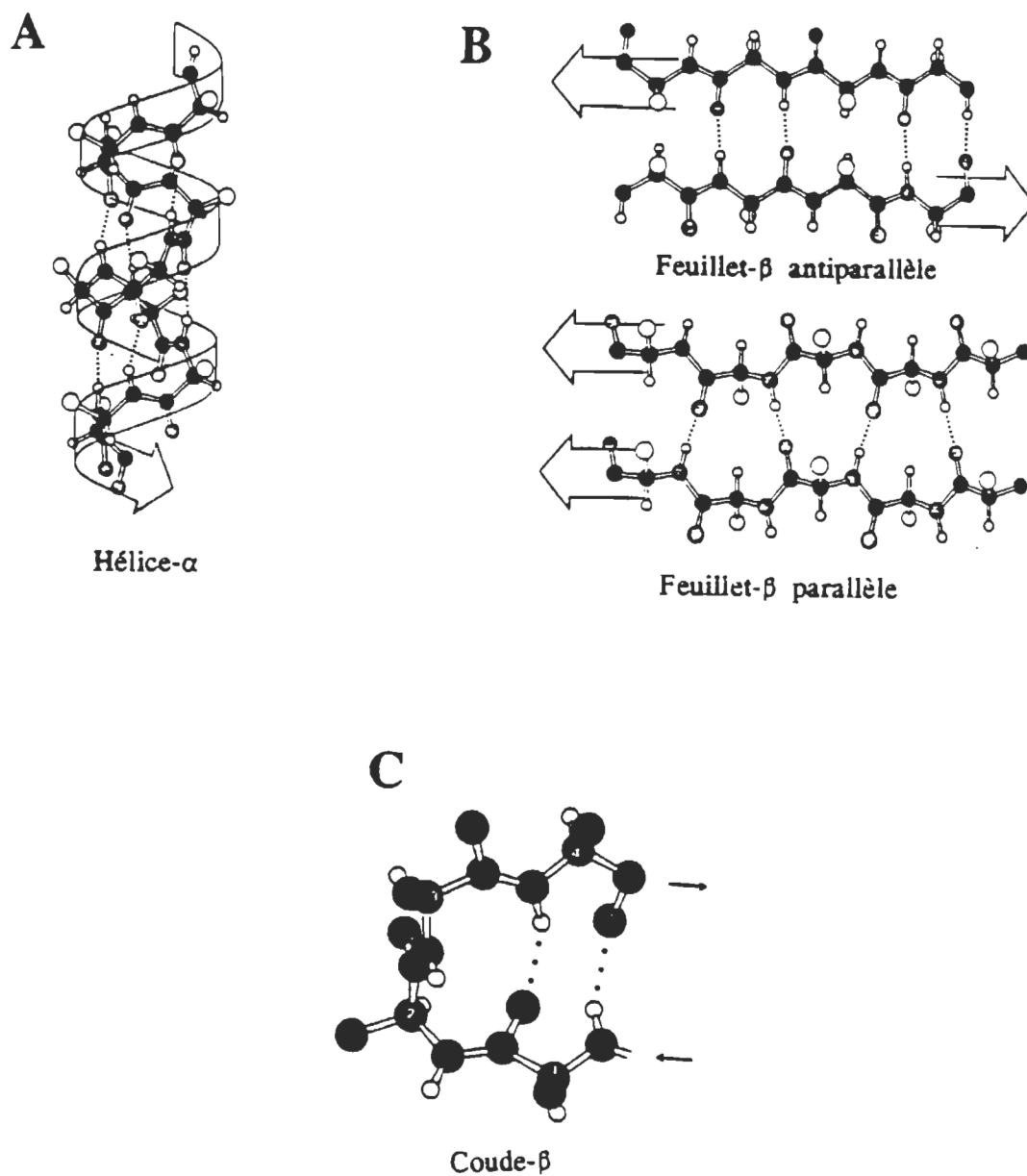


Figure 28. Quelques structures secondaires des protéines dans le complexe de PSII. A) Hélice- α [Lippard et Berg (1994)], B) feuillet- β [Lippard et Berg (1994)] et C) coude- β [Stryer (1981)].

V.1.3.2. Identification des modes vibrationnels et des structures secondaires des polypeptides du PSII

Avant d'analyser d'éventuelles modifications induites par le rayonnement UV dans le complexe de PSII, nous allons procéder à une dernière vérification de son intégrité structurale. La **figure 29** présente le spectre FTIR de films amorphes de fragments membranaires de photosystème II natif enregistré entre 4000 et 1000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} . Ce spectre est la moyenne de 120 balayages.

La large bande centrée à 3300 cm^{-1} correspond à l'amide A qui est une composante du mode d'élongation N-H [Chapados et coll. (1991), Barnett et coll. (1996), Tu (1982)]. Nous pourrions attribuer avec prudence l'épaule observée dans la région de 3077 cm^{-1} à l'amide B du mode d'élongation N-H [Chapados et coll. (1991), Barnett et coll. (1996), Tu (1982)]. Les bandes de vibration qui apparaissent à 2956 et 2928 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux modes d'élongation C-H asymétriques dans les groupements CH_3 et CH_2 des motifs d'acides aminés, des chaînes hydrocarbonées des phospholipides ainsi que des molécules de Chl [Chapados et coll. (1991), Senak et Mendelsohn (1993), Barnett et coll. (1996)]. Les bandes de vibration observées à 2873 et 2849 cm^{-1} proviennent des élongations symétriques C-H dans les groupements CH_3 et CH_2 respectivement [Colthup et coll. (1990), Chapados et coll. (1991), Barnett et coll. (1996)].

La bande de vibration centrée à 1736 cm^{-1} est due majoritairement au mode d'élongation C-O du carbonyle de l'ester de Chl [Sato et coll. (1995), Chapados et coll. (1991), Mäntele et coll. (1985), Okada et coll. (1993), Tavitian et coll. (1986)]. Les maxima d'absorption apparaissant dans les régions de 1656 et 1548 cm^{-1} sont respectivement ceux des fonctions amide I et amide II [Mäntele et coll. (1985) Dousseau et Pézolet (1990), Chapados et coll. (1991), Noguchi et coll. (1992a, 1992b, 1995), Allakhverdiev et coll. (1994), Barnett et coll. (1996), Bograh et coll. (1997), De Las Rivas et Barber. (1997)].

À 1454 cm^{-1} , nous avons probablement un mode de déformation vibrationnelle (C-H₂)_{asym} [Chapados et coll. (1991), Barnett et coll. (1996)]. Les bandes de vibration situées respectivement dans les régions de 1345 cm^{-1} et 1054 cm^{-1} seraient majoritairement attribuables à la Chl [Chapados et coll. (1991), Sato et coll. (1995)]. Nous pourrions prudemment attribuer la bande de faible intensité apparaissant dans la région de 1306 cm^{-1} au mode de vibration caractéristique de l'amide III [Chapados et coll. (1991)].

Les bandes de vibration provenant des molécules de Chl et de lipides, quoique nombreuses, n'ont pas fait l'objet d'une identification rigoureuse à cause de la faiblesse de leur intensité comparativement à celle des protéines. Les détails sur les modes de vibration IR des molécules de Chl sont donnés dans Chapados et coll. (1991), Okada et coll. (1993) ainsi que Sato et coll. (1995). Le **tableau 7** présente un résumé des principales bandes de vibration du spectre FTIR obtenu avec un film de PSII natif.

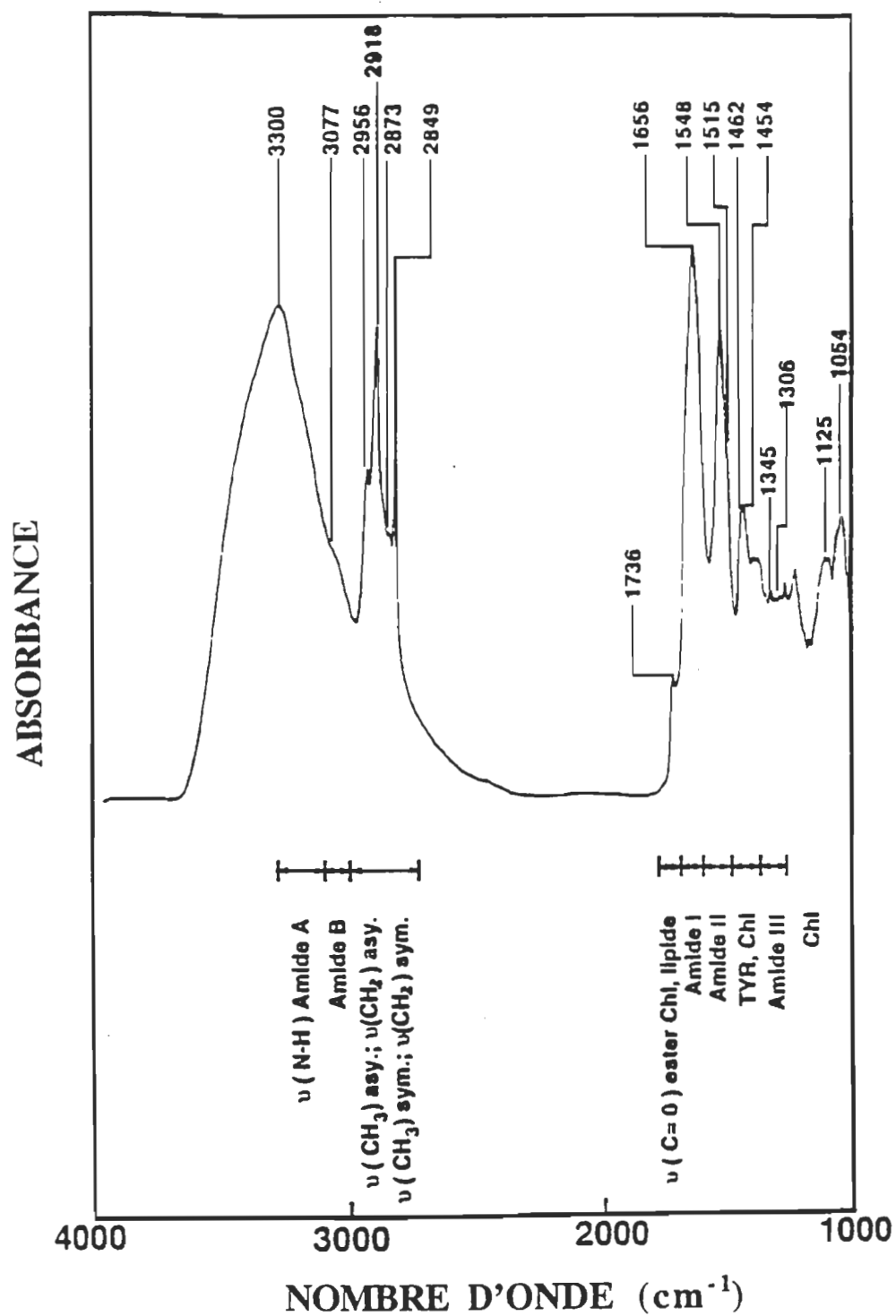


Figure 29. Spectre infrarouge par transformée de Fourier de film amorphe de fragments membranaires de PSII lavés avec du D₂O et séchés sous courant de N₂ à T ≈ 273 K.

Tableau 7. Bandes vibrationnelles du complexe de PSII natif dans la région de 4000-1000 cm^{-1} . Cette attribution est faite en considérant 132 spectres FTIR.

Nombre d'onde (cm^{-1})	Attribution
3300	Amide A
3077	Amide B
2956	CH_3 : étirement asymétrique
2928	CH_2 : étirement asymétrique
2873	CH_3 : étirement symétrique
2849	CH_2 : étirement symétrique
1736	C=O: ester, cétone libre de Chl
1656	Amide I
1548	Amide II
1515	Tyrosine (Tyr)
1454	CH_2 : déformation (déf.), CH_3 : déf. asym.
1345	Chl
1306	Amide III
1125	Chl
1054	Chl, mode squelettique.

Dans la littérature, que ce soit avec le PSII ou d'autres complexes de protéines non photosynthétiques, la caractérisation des modes de vibration des structures secondaires se limite à l'étude des bandes amides, particulièrement à l'amide I. Pour ce faire, nous avons entrepris de faire de la simulation spectrale (absorbance: A) et de la dérivée seconde (D) de cette bande amide I du PSII natif comprise entre 1700 et 1590 cm^{-1} (voir **figure 30**). Ces deux modes complémentaires de calcul nous ont permis d'obtenir approximativement le même nombre de pics d'absorption (voir **tableau 8**). Rappelons que les minima (bandes négatives) dans la dérivée seconde correspondent à l'absorption positive dans le spectre original (PSII natif) [Harris et coll. (1986, 1992)]. Ces minima se transforment en maxima (bandes positives de même signe que celles dans le spectre de PSII natif) dans une dérivée quatrième [Harris et coll. (1986, 1992)]. Dans un spectre de dérivée seconde (absorption), l'interprétation se fait en fonction des minima, car ce sont eux qui indiquent (avec précision) les positions des modes vibrationnels. Nos résultats sont en étroite accord avec ceux obtenus par He et coll. (1991), MacDonald et Barry (1992) ainsi que Noguchi et coll. (1992a).

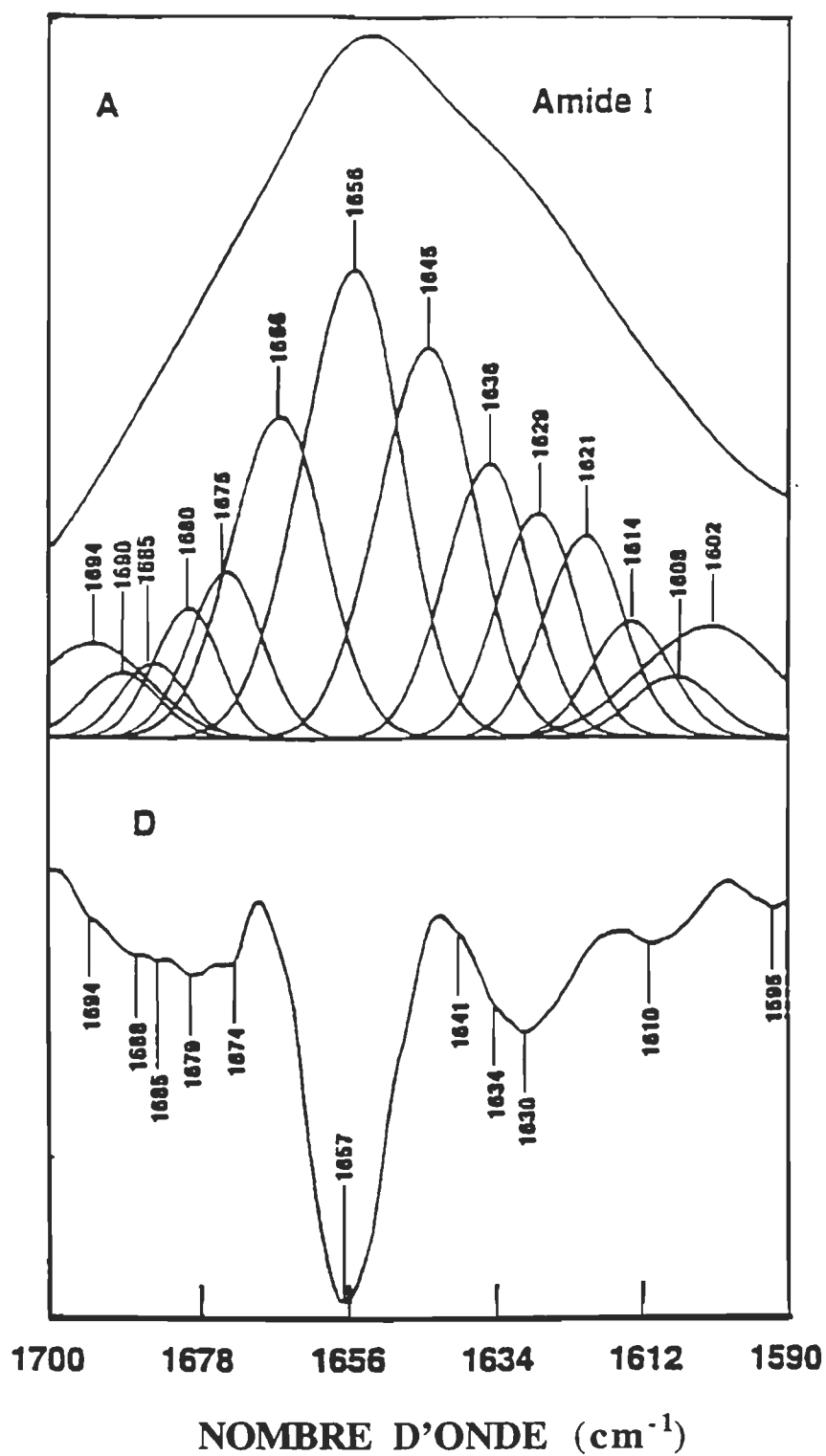


Figure 30. Bande de vibration de l'amide I du PSII: A) simulation spectrale et D) dérivée seconde.

Tableau 8. Bande amide I ($1700-1500\text{ cm}^{-1}$) de fragments membranaires de PSII natif: localisation des structures secondaires. Cette attribution est faite en considérant 21 spectres FTIR.

Autres auteurs			Ce travail		Attribution
1	2	3			
-----	-----	-----	-----	-----	
Dérivée seconde	Différence de spectres	Différence de spectres	Dérivée seconde	Simulation spectrale	
1693		1694	1695	1694	ft- β anti//
	1687	1688	1688	1690	ft- β anti//
	1682	1683	1685	1685	coude- β
1678			1679	1680	coude- β
	1673	1673	1674	1675	coude- β
				1666	hélice- α
	1663	1663			hélice- α
1657	1656	1658	1657	1656	hélice- α
	1643	1644	1641	1645	"random"
1638	1636	1637	1634	1636	feuillet- β
1628		1632	1630	1629	feuillet- β
	1618	1624		1621	feuillet- β
		1613		1614	s. n. d.
1610	1608		1610	1608	s. n. d.
		1604		1602	s. n. d.
	1596		1595		s. n. d.

1) He et coll. (1991), 2) MacDonald et Barry (1992), 3) Noguchi et coll. (1992).

s.d.n.: structures non définies

ft- β : feuillet- β .

Les faibles bandes observées entre **1694 et 1690 cm^{-1}** peuvent être interprétées comme une indication de la présence des structures en feuillet- β antiparallèles [Arrondo et coll. (1988), Halverson et coll. (1990), Caughey et coll. (1991), Nahar et coll. (1994), Bograh et coll. (1997)]. Pour Kossovsky et coll. (1994), ces bandes s'identifient aux structures en coude non ordonnées tandis que De Las Rivas et Barber (1997) suggèrent la manifestation des structures en coude- β .

Les bandes à **1685, 1680 et 1675 cm^{-1}** proviendraient des structures en coude- β [Ahmed et coll. (1995), Caughey et coll. (1991)]. Dans cette région de 1663-1689 cm^{-1} , on peut noter la présence de quelques structures en feuillet- β [Halverson et coll. (1990), Caughey et coll. (1991), Kossovsky et coll. (1994)].

La région **1666 à 1657 cm^{-1}** est dominée principalement par les structures en hélice- α [Ludlan et coll. (1995), Haris et coll. (1986), De Las Rivas et Barber (1997), Bograh et coll. (1997)].

Le maximum d'absorption des structures non ordonnées ("random") se montre à **1645 cm^{-1}** [Haris et coll. (1986), Ahmed et coll. (1995), Barnett et coll. (1996), Holzbaur et coll. (1996)].

Les bandes de vibration centrées à **1636 et 1621 cm^{-1}** représentent en majorité les structures en feuillet- β [Halverson et coll. (1990), Caughey et coll. (1991), Ahmed et coll. (1995), Holzbaur et coll. (1996), Bograh et coll. (1997), De Las Rivas et Barber (1997)]. Il faudrait préciser que De Las De Las Rivas et Barber (1997) attribuent la bande à 1621 cm^{-1} aux chaînes étendues (" β -strands" ou toron- β).

Les bandes à **1614 et 1595 cm^{-1}** ne sont pas encore identifiées dans la littérature. Ces signaux proviennent probablement des protéines (en grande partie) car ils sont présents dans les spectres FTIR de la ribonucléase A étudiée par Haris et coll. (1986, 1992). Elles peuvent être attribuées aux radicaux de tyrosine [Ludlam et coll. (1995)] et/ou aux pigments chlorophylliens [Noguchi et coll. (1993), Okada et coll. (1993)]. Bien que

présent dans leur simulation spectrale, De Las Rivas et Barber (1997)] n'ont pas pu identifier le mode vibrationnel qui correspond à la bande centrée à 1614 cm^{-1} .

La contribution de chaque structure secondaire à l'aire totale demeure difficile à évaluer parce que les frontières entre les différentes composantes de la bande amide I ne sont pas jusqu'à ce jour clairement établies. Elles semblent dépendre des conditions expérimentales et des méthodes de calcul. En ce qui concerne ce travail, nous avons obtenu $30.4 \pm 1.6\%$ de structures en hélice- α , $22.7 \pm 1.0\%$ en feuillet- β , $15.9 \pm 0.8\%$ en coude- β , $4.2 \pm 0.3\%$ en feuillet- β antiparallèle. Nous avons également obtenu respectivement $13.0 \pm 0.6\%$ et $13.9 \pm 0.6\%$ de structures non ordonnées ("random") et non élucidées. Ces résultats ont été obtenus sur 21 simulations spectrales. À l'instar de Bograh et coll. (1997), Neault et Tajmir-Riahi (1996), Ahmed et coll. (1995), Nahar et coll. (1994) ainsi que de Menikh et Fragata (1993), nous avons obtenu nos résultats en considérant la hauteur des pics. La distribution des structures secondaires évaluée dans ce travail est en accord avec les résultats de Menikh et Fragata (1994). Prenons par exemple la proportion de structures en hélice- α qui est de l'ordre de 30 % selon nos estimations. Elle est de même ordre de grandeur que la valeur (31 %) rapportée par Menikh et Fragata (1994). La convergence des résultats pourrait se justifier par le fait que Menikh et Fragata (1994), non seulement ont utilisé des particules de PSII extraites de l'orge mais aussi se sont servis des mêmes éléments mathématiques dans la simulation spectrale. D'autres auteurs comme De Las Rivas et Barber (1997)], Bograh et coll. (1997) ainsi que Nahar et coll. (1994) ont rapporté respectivement des proportions de structures en hélice- α de 40, 47 et 63 % en travaillant avec du PSII isolé des feuilles d'épinard. La raison principale qui peut justifier la différence entre leurs résultats et le nôtre est probablement la nature des deux espèces végétales. Cependant, il semble difficile de comprendre le grand écart (16-23 %) entre les résultats de ces auteurs dans la mesure où tous ces groupes ont travaillé avec la même espèce végétale et utilisé une méthode identique de calcul. Il faudrait noter que pour

déterminer la distribution en structures secondaires des protéines dans la bande amide I, plusieurs chercheurs n'ont considéré que la portion $1700\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ comme Krimm et Bandekar (1986). C'est ce qui pourrait expliquer en partie la différence qu'on observe entre nos résultats et d'autres données rencontrées dans la littérature.

Les résultats du **tableau 9** qui représentent les différentes bandes de vibration contenues dans l'amide I de quelques protéines non photosynthétiques prouvent effectivement que les bandes identifiées proviennent de la liaison peptidique des protéines du PSII. Il devient important de rappeler qu'il y a une contribution de la Chl *a* dans cette région de $1700\text{ à }1595\text{ cm}^{-1}$ [Chapados et coll. (1991), Okada et coll. (1993), Sato et coll. (1995)]. Il en est de même pour la bande apparaissant à 1643 cm^{-1} qui est attribuée au mode d'élongation C=O de la Q_B [Hienerwadel et coll. (1992)]. À cause de la forte concentration en protéine dans le PSII, la contribution des pigments et d'autres molécules (quinones etc.) à l'aire ou à la hauteur totale de la bande amide I pourrait être considérée négligeable.

Tableau 9. Bande amide I ($1700-1500\text{ cm}^{-1}$) de quelques protéines non photosynthétiques: localisation des structures secondaires.

Ribonucléase A - H ₂ O	Protéine HPr - D ₂ O	Protéine IIA ^{mtl} - D ₂ O	Pr-P-res 27- 30 -D ₂ O	Attribution
1	2	3	4	
Dérivée seconde	Dérivée seconde	Dérivée seconde	Dérivée seconde	
1689	1684	1691	1689	ft-β anti//
1681			1680	coude-β
		1677		coude-β
			1671	coude-β
1667	1655			hélice-α
1658		1657	1657	hélice-α
			1649	"random"
		1643	1643	feuillet-β
1640	1636			feuillet-β
			1637	feuillet-β
1631		1630		feuillet-β
			1627	feuillet-β
	1603		1619	s. n. d.
1614		1614		s. n. d.
				s. n. d.
1597		1597		s. n. d.

1) Haris et Chapman (1986), 2 et 3) Haris et coll. (1992), 4) Caughey et coll. (1991).

s.d.n.: structures non définies.

ft-β: feuillet-β.

V.1.3.3. Caractérisation des effets du rayonnement UV sur les polypeptides du PSII

La différence et la dérivée seconde des spectres infrarouges sont examinées pour déterminer les changements structuraux produits par les radiations UV dans nos films amorphes de fragments membranaires de PSII. Les **figures 31, 32 et 33** présentent la dérivée seconde des spectres FTIR de films de PSII mesurés respectivement avant (a) et après 60 min d'irradiation à 280, 226 et 204 nm (b). Pour $\lambda_{ir} = 280$ nm, la majorité des bandes de vibration ne changent pas de position après 60 min d'irradiation. Les variations perceptibles se produisent au niveau des bandes centrées à 1474, 1469 et 1458 cm^{-1} . Ces dernières ont subi une légère modification. Dans cette région, nous rencontrons essentiellement les modes de vibration de déformation $\text{CH}_{2\text{asym}}$ et $\text{CH}_{3\text{asym}}$ [Chapados et coll. (1991), Barnett et coll. (1996)]. Le même phénomène se produit à 1515 cm^{-1} où vibre le noyau aromatique du radical de Tyr. Ce résultat est attendu dans la mesure où le noyau aromatique de cet acide aminé absorbe le rayonnement UV autour de 280 nm. Par ailleurs, nous constatons que contrairement au cas précédent, l'irradiation des films à 226 nm conduit à la disparition des bandes de vibration centrées à 1689 et 1679 cm^{-1} au profit de celle qui apparaît à 1684 cm^{-1} . De plus, les bandes à 1629, 1609 et 1580 cm^{-1} se déplacent de 1.0 cm^{-1} vers les nombres d'onde élevés. Aussi, les bandes observées à 1496, 1467, 1458 et 1447 cm^{-1} (figure 32a) passent respectivement à 1493, 1466, 1456 et 1444 cm^{-1} (figure 32b). Les modifications provoquées par l'irradiation des films de PSII à 204 nm (figure 33) paraissent identiques à celles observées à 226 nm (figure 32). Cependant, pour $\lambda_{ir} = 204$ nm, une légère différence survient au niveau de la bande centrée à 1496 cm^{-1} qui se déplace à 1493 cm^{-1} . Considérant que nos spectres sont enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} et que les nombres d'onde sont estimées à $\pm 0.5 \text{ cm}^{-1}$, ces variations de position de 1 à 3 cm^{-1} peuvent paraître alors moins significatives. Cependant, cet ordre de grandeur des changements observés dans les spectres est attendu à cause des faibles intensités de

lumière UV utilisées. Ainsi, nous envisageons les modifications induites dans les films de PSII sous forme de changement conformationnel précédant la photodégradation.

L'utilisation de la dérivée seconde comme mode de calcul nous a permis de mettre en évidence des changements (position des minima d'absorption) de faibles amplitudes induits par le rayonnement UV dans le PSII. Cependant, dans un souci d'effacer toute équivoque dans l'élucidation des effets des radiations UV, nous allons poursuivre notre analyse en utilisant la différence des spectres FTIR comme l'ont fait avant nous MacDonald et coll. (1993), Maeda et coll. (1994), Noguchi et coll. (1993, 1995), Barnett et coll. (1996) ainsi que Bograh et coll. (1997).

Les différences spectrales sont obtenues en soustrayant des spectres FTIR de films de PSII gardés dans l'obscurité ou traités aux radiations UV au temps $t_{ir} = x$ min de ceux qui sont enregistrés avant l'irradiation, c'est-à-dire tout juste à la fin du séchage ($t_{ir} = 0$ min). Les différences de spectres présentées aux figures 34, 35, 36 et 37 montrent des bandes négatives et positives plus ou moins alternées mettant en évidence les diminutions ("downshift") et les augmentations ("upshift") de certains modes de vibration [Noguchi et coll. (1993)]. Les bandes négatives reflètent une baisse d'intensité au niveau du mode de vibration dans l'échantillon traité alors que les bandes positives traduisent le phénomène contraire. Selon Berthomieu et coll. (1990), les bandes négatives sont reliées à la disparition de l'espèce chimique dans son état neutre, tandis que les positives indiquent la présence de l'espèce réduite. D'une façon générale, le comportement des modes de vibration dans une différence spectrale dépend sûrement des conditions expérimentales [voir MacDonald et coll. (1993), Maeda et coll. (1994), Noguchi et coll. (1993, 1995), Barnett et coll. (1996), Bograh et coll. (1997)].

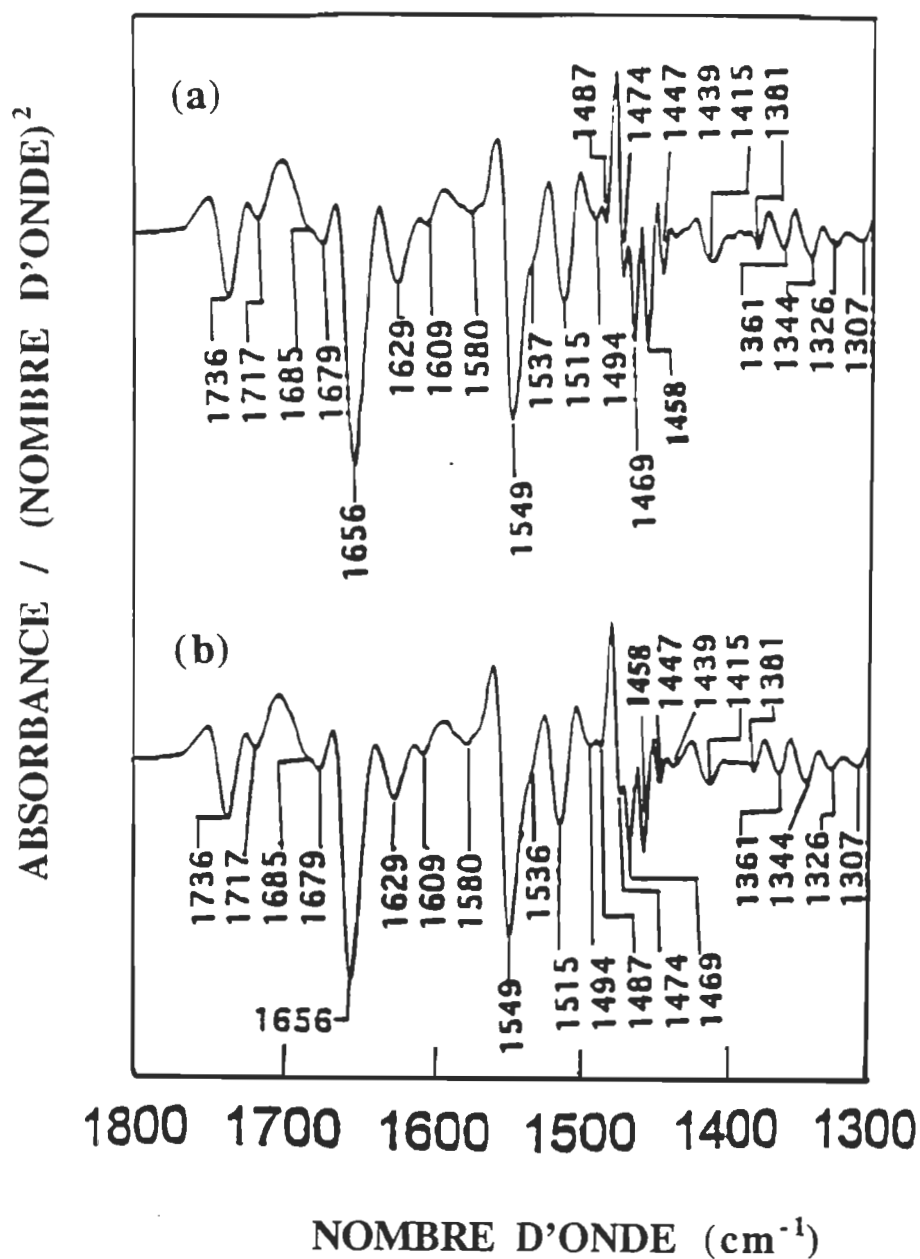


Figure 31. Dérivée seconde de spectres FTIR obtenus avec un film amorphe de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T \approx 273 \text{ K}$. a) Avant irradiation, b) après 60 min d'exposition continue à la lumière UV de 280 nm pour $I_{\text{inc}} = 2.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

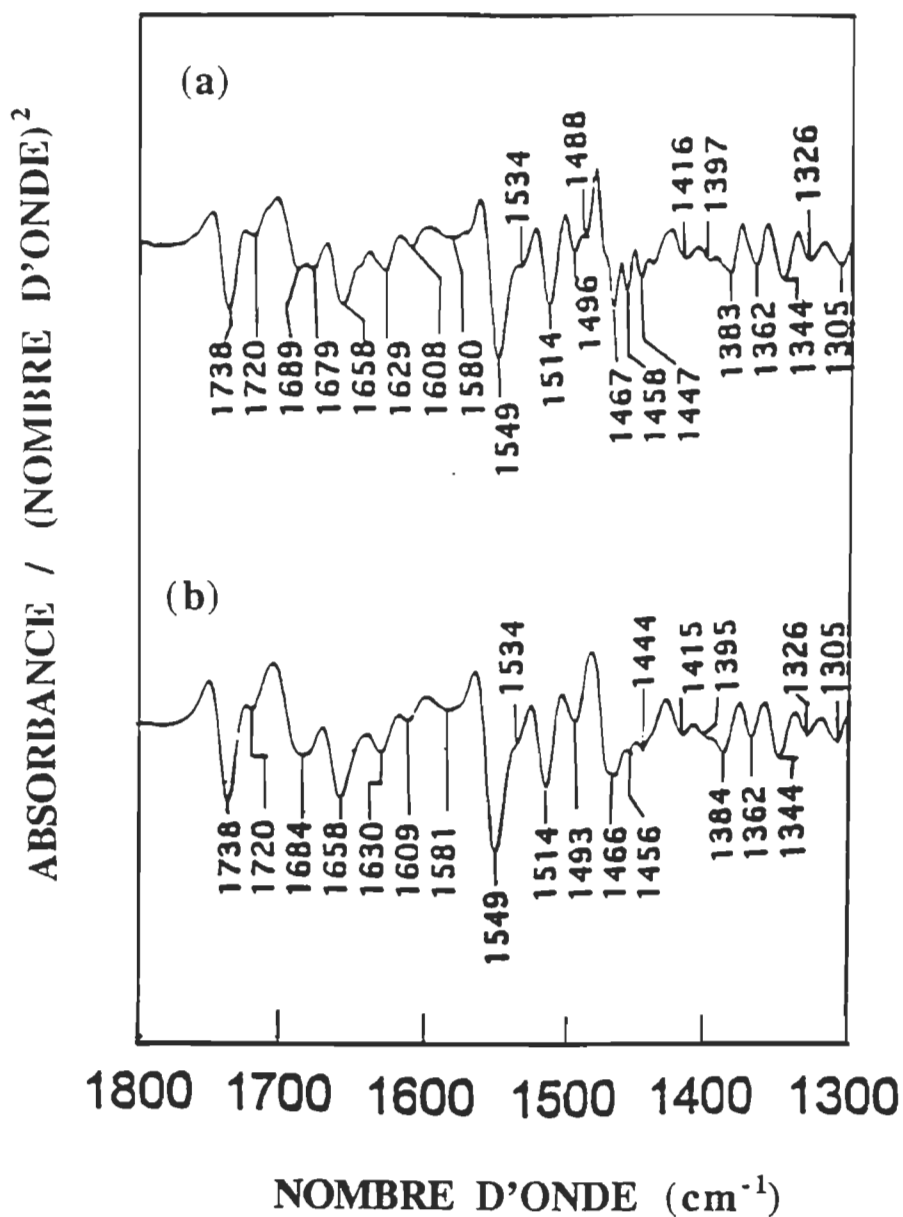


Figure 32. Dérivée seconde de spectres FTIR obtenus avec un film amorphe de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T = 273 \text{ K}$. a) Avant irradiation, b) après 60 min d'exposition continue à la lumière UV de 226 nm pour $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

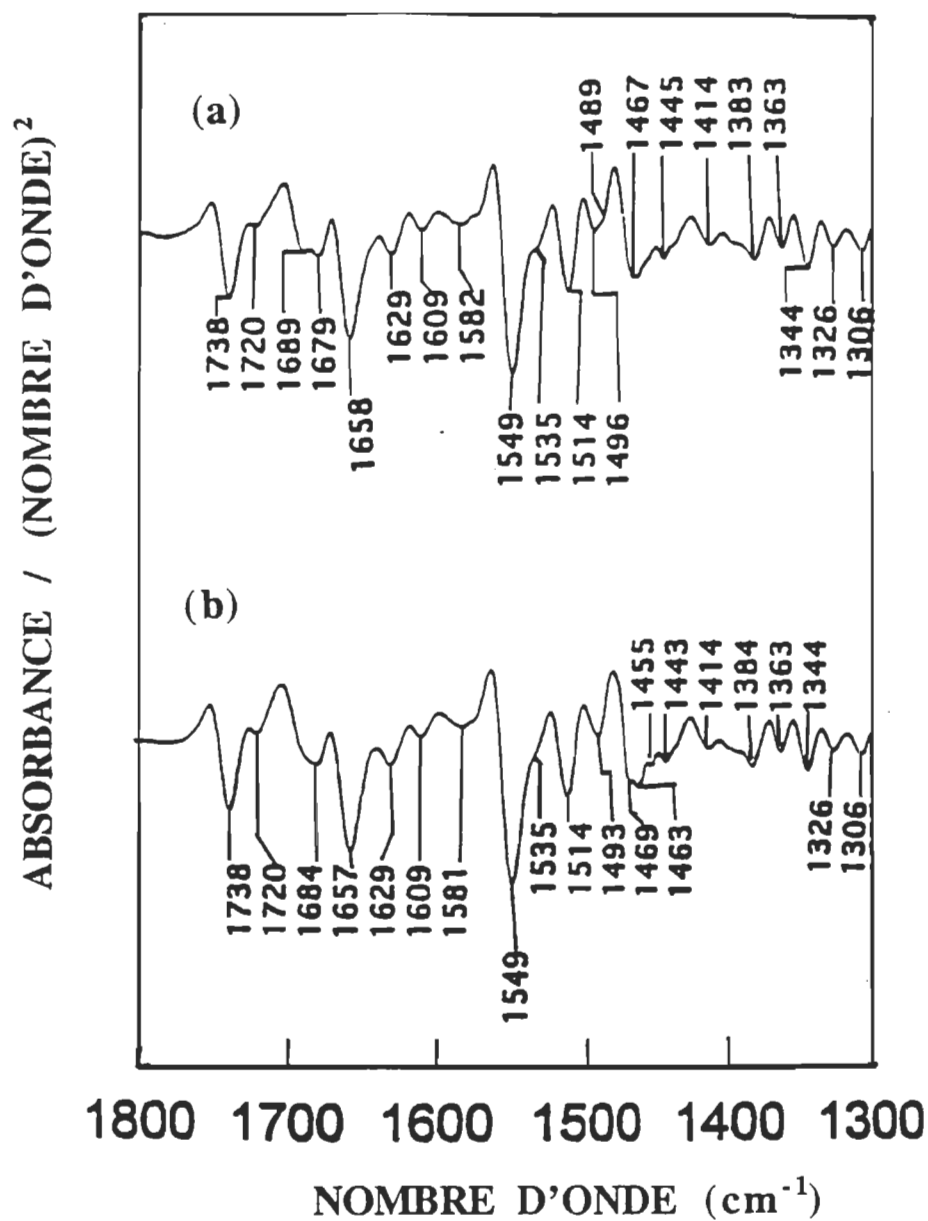


Figure 33. Dérivée seconde de spectres FTIR obtenus avec un film amorphe de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T \approx 273 \text{ K}$. a) Avant irradiation, b) après 60 min d'exposition continue à la lumière UV de 204 nm pour $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

Avant d'entreprendre une étude FTIR des effets des radiations UV, examinons les spectres de différence de la **figure 34** obtenues avec des films de fragments membranaires PSII maintenus dans l'obscurité. Nous notons après approximativement 60 min (après le séchage) dans l'obscurité à environ 276 K, des modifications bien distinctives apparaissent au niveau de plusieurs modes vibrationnels. Dans ces spectres de différence, nous observons en majorité des bandes négatives à 1726 et 1407 cm^{-1} et dans les régions 1700-1500 et 1458-1447 cm^{-1} . Quelques bandes positives d'intensité moyenne se montrent à 1768-1751, 1497-1483, 1388 et 1336 cm^{-1} . La région des fonctions amides I et II (1770-1500 cm^{-1}) de la figure 34b est caractérisée par une unique et large bande négative. Son intensité est d'environ 1 % de celle des bandes originales présentes dans le spectre du PSII natif (**figure 34a**). Cette baisse d'absorbance atteint une amplitude de l'ordre de 3 % environ 300 min après le séchage (**figure 34d**). Pour un séjour dans l'obscurité de plus 60 min, nous percevons une amorce de dédoublement de cette large bande à 1700-1500 cm^{-1} conduisant à celles de 1615 et 1572 cm^{-1} . Cette variation négative d'intensité observée dans la **figure 34** suggère un certain degré de changement conformationnel intervenu au niveau de certains complexes pigment-protéines du PSII [Bograh et coll. (1997)]. Quant aux bandes positives, elles constituent une indication d'interactions intermoléculaires (présence des liaisons hydrogènes) [Bograh et coll. (1997)].

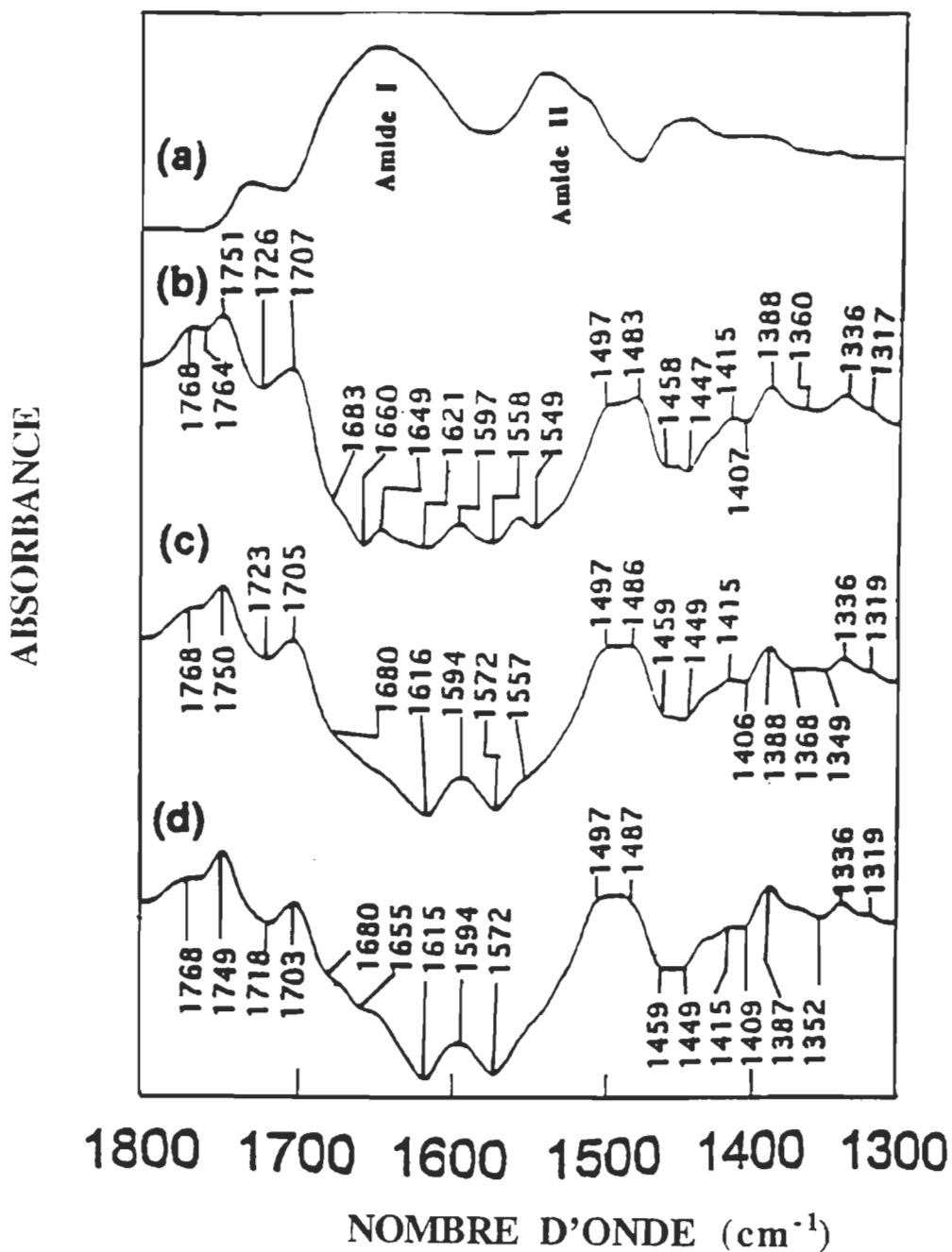


Figure 34. Changements induits dans les films contrôle de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T \approx 273 \text{ K}$. a) Spectre FTIR de PSII natif; b, c et d) différences de spectres obtenues après un séjour respectif de 60, 90 et 300 min dans l'obscurité.

Parallèlement aux phénomènes d'obscurité mentionnés ci-dessus, nous allons analyser les transformations induites par les radiations UV dans les films de PSII. Les **figures 35, 36 et 37** nous montrent respectivement les différences spectrales issues de l'exposition des échantillons à la lumière UV à 280, 226 et 204 nm à divers temps d'irradiation: a) 30, b) 60 et c) 90 min.

D'une vue d'ensemble, nous remarquons que 30 min d'illumination conduisent à des spectres de différence (**figures 35b, 36b et 37b**) à peu près similaires à celles obtenues avec les films contrôle. Cela signifie qu'après une demi-heure d'irradiation, les effets de la lumière UV ne sont pas encore assez incisifs pour se distinguer des phénomènes d'obscurité.

Cependant, après 60 min d'irradiation continue à 280, 226 et 204 nm nous notons des changements nets dans les spectres de différence des **figures 35c, 36c et 37c**. Ils se traduisent par l'apparition des bandes positives dans la région de 1718 cm^{-1} (épaulement), $1654\text{-}1627$, 1559 , 1459 cm^{-1} (**figure 35c**: 280 nm); $1760\text{-}1726$, 1615 (légèrement +), 1484 , 1396 , 1333 , 1264 , 1214 (**figure 36c**: 226 nm) ainsi que de $1789\text{-}1719$, 1621 , 1401 , 1333 , 1244 cm^{-1} (**figure 37c**: 204 nm). Nous y observons aussi des bandes négatives dont les plus importantes se présentent à 1494 , $1222\text{-}1159\text{ cm}^{-1}$ (**figure 35c**: 280 nm); à 1654 , 1547 , 1447 , $1301\text{-}1286$, 1151 cm^{-1} (**figure 36c**: 226 nm) et enfin à 1691 , 1660 , 1563 , $1547\text{-}1515$, 1448 , $1301\text{-}1287$, 1151 cm^{-1} (**figure 37c**: 204 nm).

Lorsque l'irradiation des films de PSII avec la lumière UV se poursuit jusqu'à 90 min (voir **figures 32d, 33d, 34d**), les modifications structurelles deviennent plus marquées, surtout dans la région de $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. Les bandes positives à 1627 cm^{-1} (**figure 35d**: 280 nm), 1615 cm^{-1} (**figure 36d**: 226 nm) et 1621 cm^{-1} (**figure 37d**: 204 nm) disparaissent au profit de celles à 1668 (+), 1615 (-), 1562 cm^{-1} (-) [**figure 35d**: 280 nm], 1631 cm^{-1} (-) [**figures 36d et 37d**: 226 et 204 nm respectivement] ainsi qu'à 1555 cm^{-1} (-) [**figure 36d et 37d**: 204 nm]. Les résultats obtenus pour $0 < t_{ir} < 90$ min, illustrent le caractère sélectif des

photons UV vis-à-vis de certaines liaisons moléculaires dans le PSII. t_{ir} est le temps d'irradiation des échantillons avec de la lumière UV. Dans cet intervalle de temps, l'irradiation des échantillons à 280 et 204 nm conduit à un rapport d'intensité des bandes amides I et II ($I_{amide\ I} / I_{amide\ II}$) de l'ordre de 1.5 et 2.0 respectivement. Ce rapport varie d'environ 0.8 à 1.0 pour la longueur de 226 nm.

Ce phénomène de sélectivité du rayonnement UV vis-à-vis des fonctions amides est tout à fait nouveau. Il se reproduit significativement d'une expérience à l'autre. Ce caractère sélectif des photons UV observé dans cette région de 1700-1500 cm^{-1} s'expliquerait probablement par la différence en structures secondaires protéiniques qui sont à l'origine des bandes amides I et II centrées respectivement à 1657 et 1548 cm^{-1} (**figures 35a, 36a et 37a**).

D'une manière globale, les résultats présentés dans cette première section de ce chapitre montrent clairement les effets des rayons UV sur les composants moléculaires du PSII que nous avons prévus dans nos objectifs (voir **figure 4** au **Chapitre I**). Ces effets seront discutés en détail ci-dessous.

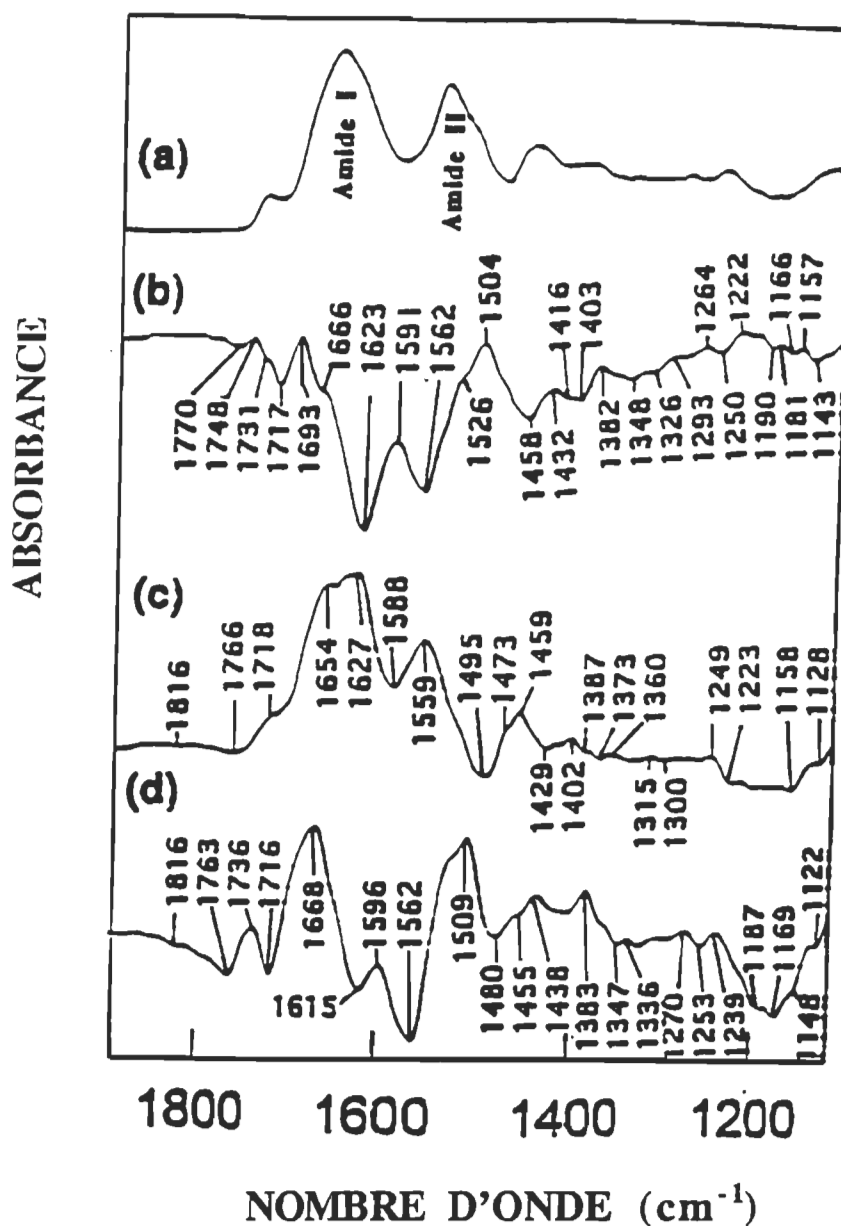


Figure 35. Changements induits dans les films de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T \approx 273$ K. a) Spectre FTIR de PSII natif; b, c et d) différences de spectres obtenues respectivement après 30, 60 et 90 min d'irradiation à 280 nm pour $I_{inc} = 2.0 \text{ W. m}^{-2}$.

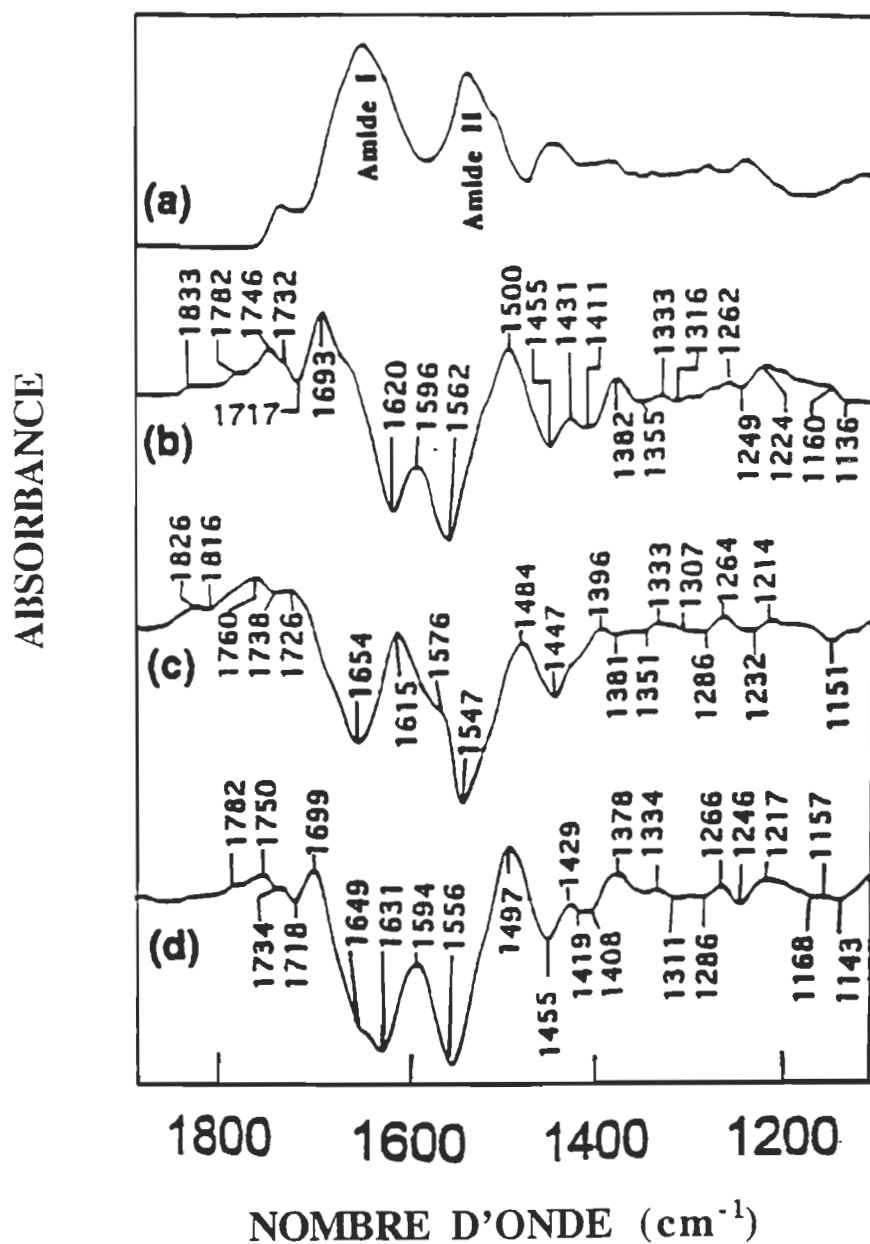


Figure 36. Changements induits dans les films de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T \approx 273 \text{ K}$. a) Spectre FTIR de PSII natif; b, c et d) différences de spectres obtenues respectivement après 30, 60 et 90 min d'irradiation à 226 nm pour $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

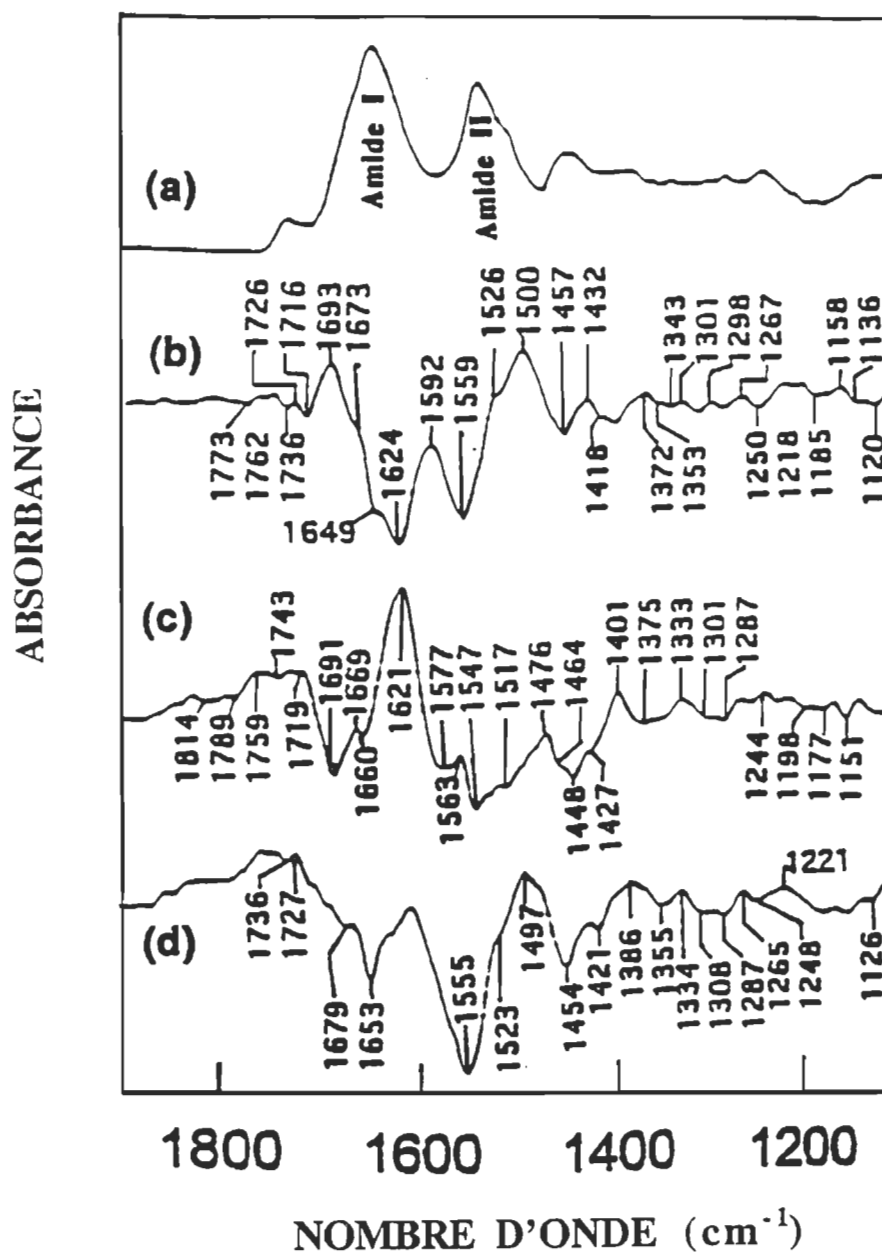


Figure 37. Changements induits dans les films de PSII lavé avec du D_2O et séché sous courant de N_2 à $T \approx 273 \text{ K}$. a) Spectre FTIR de PSII natif; b, c et d) différences de spectres obtenues respectivement après 30, 60 et 90 min d'irradiation à 204 nm pour $I_{\text{inc}} = 0.5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

V.2. Discussion

À travers la première section de ce chapitre, nous avons fait une investigation des effets des radiations UV sur les composantes structurales du PSII. D'une manière globale, nous avons observé que la modification de la structure des protéines, i.e. leur photodégradation (voir **section V.1.2**) et des pigments photosynthétiques majeurs, i.e. leur photoblanchiment (voir **section V.1.1**), du PSII sous l'effet de la lumière UV suit une cinétique très lente comparativement au phénomène de photo-inhibition présenté au chapitre précédent (voir **sections IV.1.2 et IV.1.3**). Il est toutefois clair que la photo-inhibition de l'activité photosynthétique et la photomodification structurale des composants moléculaires augmente avec la durée d'irradiation. Ceci est discuté ci-dessous.

V.2.1. Les pigments photosynthétiques

En ce qui concerne les pigments photosynthétiques, les résultats montrent une plus grande sensibilité des molécules de Chl *a* aux radiations UV par rapport aux autres pigments chlorophylliens: Chl *b* et Phé. Ils sont en accord avec ceux de Panagopoulos et coll. (1990) ainsi que de Strid et coll. (1990). Cependant, nous notons une divergence entre nos résultats et ceux de Panagopoulos et coll. (1990) à propos du comportement des caroténoïdes (β -carotène). Ces auteurs n'observèrent pas de diminution de la teneur en caroténoïdes. Nous croyons que le changement d'environnement des particules de PSII (PSII isolé) pourrait être l'élément qui favorise la dégradation des molécules de β -carotène en présence de la lumière UV. En étant situés en bout de chaîne de dissipation d'énergie, les caroténoïdes exercent habituellement une fonction de protection de la Chl contre la photo-oxydation [Krinsky (1978), Carpentier et coll. (1987), Sieferman-Harms (1987), Miller et Carpentier (1991)].

Que ce soit dans les systèmes intacts ou les particules isolées, la grande sensibilité que montre la Chl a peut avoir une conséquence énorme sur l'activité photosynthétique. Deux scénarios se présentent à nous pour relier la photo-inactivation des particules au photoblanchiment des pigments, spéciquement de la Chl a.

(1) Dans le cas où l'énergie UV absorbée est canalisée vers le centre réactionnel (comme dans le cas de la lumière visible), les pigments localisés dans le complexe central ("core complex") seront plus exposés au photoblanchiment que ceux des antennes périphériques [Carpentier et coll. (1986)]. Ainsi, les quatre molécules de Chl a qui relient les protéines D1 et D2 au niveau du centre réactionnel (voir **figure 21**) se dégraderont sans doute plus rapidement à cause de l'excès d'énergie qu'elles reçoivent en provenance des caroténoïdes et des Chl b [Carpentier et coll. (1986)]. Il en résulterait la désorganisation des complexes pigment-protéines du complexe central et par conséquent de la photo-inhibition de l'activité de transfert d'électrons.

(2) Si le phénomène n'est pas identique à celui de la lumière visible, le photoblanchiment rapide observé serait celui des molécules de Chl a dans les complexes antennes. Dans ce cas, la photo-inhibition de l'activité des particules de PSII proviendrait en partie de l'incapacité des pigments photo-oxydés à assumer le transfert d'excitons jusqu'au centre réactionnel [Lee et coll. (1990), Park et coll. (1995, 1996), Sinclair et coll. (1996)]. Sachant que Costes (1978) a observé à la fois la photosynthèse et la photo-inhibition dans la région UV considérée dans ce travail, il devient alors difficile d'identifier lequel des mécanismes de photomodification structurale des pigments qui conduit à l'inactivation des particules de PSII. Cependant, le fait que les maxima d'absorption des pigments n'ont pas subi de modification significative constitue probablement une indication de la présence d'une grande quantité de chlorophylles antennes périphériques (LCHII) qui blanchiraient

probablement de manière homogène [Zuccheli et coll. (1988), Miller et Carpentier (1991)]. C'est ce qui pourrait justifier sans doute la ressemblance entre les spectres de la **figure 23**. Ce résultat semble favoriser la proposition de Sinclair et coll. (1996)] (désexcitation d'une petite fraction de pigments photosynthétiques qui serait responsable de la photo-inhibition du PSII) basée sur la *théorie des cibles* d'Altman et coll. (1970). Cependant, il devient nécessaire de mentionner que l'utilisation de la théorie d'Altman et coll. (1970) pour décrire les effets des rayons ultraviolets sur le PSII doit se faire avec une grande prudence à cause de la méconnaissance des cibles primaires.

V.2.2. Les polypeptides du complexe de PSII

Le **tableau 6** (section V.1.2) montre qu'après 90 min d'irradiation à 280 nm, une baisse d'intensité est enregistrée au niveau de la majorité des bandes d'absorption des polypeptides (électrophorèse SDS-PAGE). À travers cette section qui concerne le comportement des polypeptides en présence du rayonnement UV, l'accent sera mis sur un phénomène tout à fait nouveau, c'est-à-dire le comportement des protéines D2 et de 23 kDa face à l'irradiation avec de la lumière de 280 nm.

En effet, la diminution de la concentration en protéine D2 est environ deux fois plus rapide que celle de la D1 (voir **tableau 6**, section V.1.2). Cela prouve que dans nos conditions expérimentales, la protéine D1 montre une plus forte résistance vis-à-vis des photons UV à 280 nm que la D2, contrairement à ce qui a été rapporté par Frisco et coll. (1993, 1994, 1995), Greenberg et coll. (1989) ainsi que Barbato et coll. (1994). Ces résultats n'infirment pas forcément les nôtres dans la mesure où ces groupes de recherche ont travaillé avec des membranes de thylacoïdes ou des feuilles entières dans le domaine de l'UV-B (320-280 nm) en utilisant des filtres dont le maximum de transmission se trouve

autour de 312 nm. Dans ces systèmes photosynthétiques, la photodégradation de la D1 est vue sous forme de rotation de synthèse protéinique ou "turnover" [Greenberg et coll. (1989)]. Nous préférons garder le terme "turnover" parce qu'il est plus usuel que rotation. Lorsque la protéine photodégradée est aussitôt remplacée par une autre nouvellement synthétisée et identique, on parle de "turnover". Soulignons que dans ce travail, une telle éventualité est impossible parce que les particules de PSII isolé sont dépourvues de cette capacité de réparation de photodommages ou de synthèse. Dans ce contexte, la photodégradation à 280 nm des protéines du PSII isolé nous apparaît comme étant un phénomène par prédominance photochimique. Certes la photodégradation des protéines D1 et D2 du centre réactionnel est dépendante de l'environnement des particules (PSII isolé ou PSII dans le chloroplaste). Aussi, il semble probable que les mécanismes de photomodification ou de photodégradation de la structure de ces protéines soient différents en présence de faibles ou de fortes intensités de lumière UV.

D'une façon surprenante, la protéine de 23 kDa suit une cinétique de photodégradation plus lente que celle de 33 kDa (voir tableau 6, partie V.1.2). Les raisons de ce phénomène ne sont pas encore claires. Selon le modèle de PSII proposé par Wydrzynski et Hansson (1990), la protéine extrinsèque de 23 kDa est localisée entre celles de 33 et 16 kDa (structure en "sandwich"). Donc, une photodégradation plus importante de la 16 kDa par rapport aux deux autres protéines extrinsèques semble *à priori* vraisemblable dans la mesure où elle est la plus exposée (externe) aux photons UV. En vertu de cette disposition des polypeptides, nous devrions enregistrer une perte plus significative au niveau de la 23 kDa que la 33 kDa, mais c'est le cas contraire qui est observé. L'inefficacité de l'action des photons UV sur la protéine de 23 kDa est difficile à expliquer dans la mesure où les trois protéines extrinsèques possèdent le même nombre de radicaux d'acides aminés aromatiques [Ghanostakis et Yocum (1985)]. Notre résultat remet apparemment en question

l'arrangement des protéines extrinsèques proposé par Wydrzynski et Hansson (1990). Tout laisse croire que l'absorption du polypeptide de 23 kDa dans le complexe coeur ("core complex") du PSII est indépendante de la liaison des protéines de 16 et 33 kDa qui forment un ensemble moléculaire ou "cluster" structural de sensibilité plus grande aux rayons UV à 280 nm. La disposition des trois protéines extrinsèques à la face lumenale du PSII que suggèrent nos résultats se rapprocherait davantage de celle proposée par Dau en 1994 ainsi que Murata et Miyao en 1989. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Bernier et Carpentier (1995). Après un traitement chimique des particules de PSII (extraites des feuilles d'orge) avec du chlorure de mercure (HgCl_2), ces chercheurs notèrent une perte de la protéine de 33 kDa alors que celles de 23 et 16 kDa restèrent in affectées. Ainsi, les résultats de Bernier et Carpentier (1995) démontrent aussi que les protéines extrinsèques sont probablement dans une configuration autre que celle proposée par Wydrzynski et Hansson (1990), ce qui est aussi notre conclusion.

Dans le cas où le modèle proposé par Wydrzynski et Hansson (1990) serait plus véridique, la résistance de la protéine de 23 kDa vis-à-vis des photons UV ne serait qu'apparente. En d'autres termes, la protéine de 23 kDa subirait autant de photodommage que les deux autres. Cette dégradation pourrait sans doute être masquée par la fragmentation de certains polypeptides de poids moléculaire élevé. Plusieurs études dans lesquelles la technique d'immunobuvardage a été utilisée ont permis de mettre en évidence des produits de la fragmentation des protéines D1 et D2. Par exemple, Barbato et coll. (1995) ont rapporté que l'irradiation des feuilles intactes d'épinard et des fragments membranaires de PSII avec de la lumière UV-B *in vivo* et *in vitro* engendrait des polypeptides de 20 kDa de terminaison C et de 13 kDa de terminaison N comme indicatifs de la rupture dans le second segment transmembranaire de la protéine D1. Aussi, Melis et coll. (1992) ont détecté la présence des produits de dégradation de 15, 13, 5 kDa des

protéines du centre réactionnel. Greenberg et coll. (1989) ainsi que Frisco et coll. (1993) ont identifié respectivement des fragments de poids moléculaire d'environ 23.5 et 23 kDa provenant du clivage de la protéine D1. De plus, Frisco et coll. (1994) ont observé des fragments de rupture de 22 et 12 kDa issus de la dégradation de la protéine D2 lorsque les particules de CR-PSII sont soumises à une irradiation UV-B. Alors, il paraît raisonnable que la génération de tels fragments d'environ 22, 23 et 23.5 kDa puisse atténuer le dommage apparent sur le gel d'électrophorèse causé par l'irradiation à 280 nm de la protéine extrinsèque de 23 kDa.

À travers toutes ces études qui font état du clivage des protéines en présence des rayonnements UV-B (radiations émises précisément à 312 nm), la plastoquinone ou quelques unes de ses formes réduites sont indiquées comme étant les principaux sensibilisateurs du phénomène dans le complexe de PSII. Cependant, avec l'utilisation dans ce travail d'un faisceau monochromatique à 280 nm, il semble probable que la photofragmentation des protéines soit initiée en grande partie par certains motifs d'acides aminés aromatiques, des radicaux libres d'oxygène ou l'oxygène singulet. D'autres sensibilisateurs pourraient être les atomes de Mn. Barbato et coll. (1995) ont démontré récemment que la présence de Mn fonctionnellement actif est requis pour l'apparition des produits de rupture (8 kDa et 20 kDa) de la protéine D1. Cela sous-entend que le photoclivage de la protéine D1 à ce site particulier est possiblement modulé par l'état global du tétramère (enzyme de dégradation de l'eau).

V.2.3. Les modes vibrationnels du PSII

La grande sensibilité de la technique FTIR nous a permis de déterminer les effets spécifiques des radiations sur les modes vibrationnels du PSII en utilisant la différence des

différences $\Delta(\Delta A)$ de spectres FTIR à $t_{ir} = 60$ min. $\Delta(\Delta A)$ constitue la correction par rapport aux phénomènes d'obscurité présentés plus haut (voir partie V.1.3.3). Ces différences spectrales corrigées sont présentées à la **figure 38**.

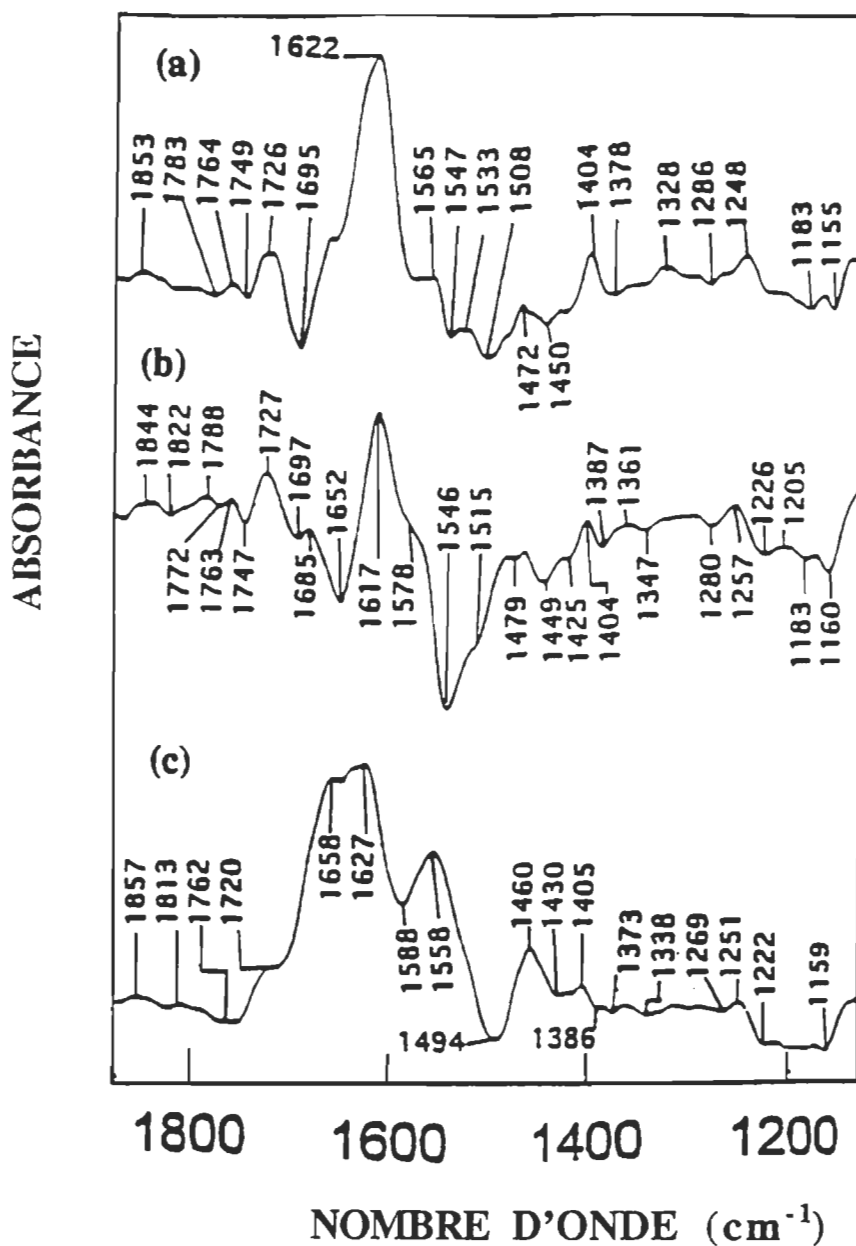


Figure 38. Effets spécifiques du rayonnement monochromatique UV après 60 min d'irradiation des particules de PSII: a) 204 nm (0.5 W. m⁻²), b) 226 nm (0.5 W. m⁻²) et c) 280 nm (2.0 W. m⁻²). a, b et c représentent respectivement des différences spectrales corrigées par rapport aux contrôles.

Le choix de ces différences corrigées de spectres à $t_{ir} = 60$ min découle d'une série de considérations.

- (1) Nous partons du fait que l'irradiation des films amorphes de PSII à 280 nm (2.0 W.m^{-2}), 226 et 204 nm (0.5 W.m^{-2}) pendant environ 60 min conduit à une chute substantielle de leur activité de transfert d'électrons comparativement aux échantillons contrôle respectifs qui conservent leur intégrité fonctionnelle.
- (2) De plus, pour $t_{ir} < 60$ min, l'impact des photons UV sur les modes vibrationnels demeure difficilement perceptible.
- (3) Finalement, mentionnons qu'au-delà de 60 min, l'activité commence à décliner au niveau des films contrôle.

Notre analyse se fait en scindant les spectres de la **figure 38** en deux portions: $\nu > 1700 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu < 1500 \text{ cm}^{-1}$. Nous ne tenons compte que des photomodifications survenues dans la région de $\nu > 1500 \text{ cm}^{-1}$ à cause des nombreuses bandes de vibration de faible intensité qui caractérisent la partie de $\nu < 1500 \text{ cm}^{-1}$. En effet, les modifications observées dans la région de $1800\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ laissent entrevoir une forte implication du groupe carbonyle (C=O) rencontré dans plusieurs constituantes moléculaires du PSII. D'ailleurs, la présence des bandes à 1622 (+) et 1695 (-) cm^{-1} (**figure 38a**); 1617 (+), 1652 (-) et 1697 cm^{-1} (**figure 38b**) et 1658-1627 (+) cm^{-1} (**figure 38c**) pourrait constituer une indication de la contribution du mode d'élongation C=O de la fonction amide I.

Nous notons aussi qu'après irradiation à 204 et 226 nm, les bandes centrées à 1622 et 1617 cm^{-1} subissent respectivement un "downshift" à 1565-1508 cm^{-1} et 1546 cm^{-1} . Cela sous-entend qu'outre le mode de vibration d'élongation C=O, celui de déformation C-N caractérisant la fonction amide II de la liaison peptidique est impliqué dans le processus de photomodification induite par les radiations UV dans le PSII.

Les bandes négatives dans la région de $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ sont perçues comme le résultat d'une perturbation ou dénaturation de certaines structures secondaires suite à l'interaction des photons UV (226 et 204 nm) avec les protéines [Bograh et coll. (1997)].

Quant aux bandes positives à $1622\text{ et }1617\text{ cm}^{-1}$, elles reflètent probablement un accroissement des structures secondaires en feuillet- β au détriment de celles en hélices- α ($1652\text{ et }1546\text{ cm}^{-1}$). Cette hausse d'intensité dans les films irradiés suggèrent l'existence d'interactions intermoléculaires (liaisons hydrogènes) dans lesquelles sont impliqués les groupements fonctionnels C=O et C-N [Bograh et coll. (1997)]. Ces interactions sont rencontrées en majorité dans les films de PSII exposés pendant 60 min au rayonnement UV à 280 nm (figure 38c). Elles se présentent sous forme de hausse d'intensité dans la région des bandes amides I et II.

La baisse réelle d'intensité constatée à 280 nm se produit à $1494\text{ (-)}\text{ cm}^{-1}$. Cette variation négative est aussi notée à 204 nm (**figure 38a**) et 226 nm (épaulement: **figure 38b**). Elle résulte probablement de l'action délétère des radiations UV sur les radicaux de Tyr. D'une façon spécifique, la large bande négative centrée à 1494 cm^{-1} peut englober le changement structurel survenu au niveau du noyau aromatique des radicaux de Tyr. Cette hypothèse semble tout à fait fondée dans la mesure où les principales transitions électroniques de la chaîne latérale de la Tyr se présentent autour de ces longueurs d'onde d'irradiation [Sreerama et coll. (1998), Dodonova (1993), Smith (1989)]. Aussi, selon les travaux de Ludlam et coll. (1995), MacDonald et coll. (1993), MacDonald et Barry (1992), Gabashvili et coll. (1998) ainsi que notre **figure 39**, les bandes de vibration de cet acide aminé se rencontrent dans cette région de $1520\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$. Il faudrait souligner que généralement dans les spectres FTIR de protéines ou du complexe de PSII, le radical de Tyr s'identifie de par la bande à 1515 cm^{-1} attribuée au noyau aromatique [McDonald et coll. (1992), Rath et coll. (1991), Mitchell et coll. (1988)]. Donc, suite à la photomodification du radical de Tyr (perturbation du moment dipolaire), cette bande centrée à 1515 cm^{-1} se

déplace vers les faibles nombres d'onde tout en perdant d'intensité. Sur cette base, le noyau aromatique des radicaux de Tyr du PSII (incluant la Tyr_Z impliqué dans le transfert d'électrons) peut être considéré comme une cible privilégiée de ces photons UV dans le complexe de PSII. Par contre, l'importance des effets des photons UV sur la Tyr_Z dépendrait sans doute de sa localisation dans le PSII et de la durée d'exposition.

Comme la baisse globale d'intensité (ΔA) / (A) enregistrée aux trois longueurs d'onde varie entre 0.3 et 2 %, nous estimons alors que seulement une quantité très infime de structures secondaires sont probablement affectée. En estimant faible une telle diminution d'intensité (0.3-2 %), nous pensons que les bandes négatives observées dans les différences spectrales pourraient aussi provenir des molécules autres que les protéines. La preuve en est que la bande à 1652 cm^{-1} (-) vue comme un affaiblissement des structures en hélice- α pourrait résulter du "downshift" de la bande à 1726 cm^{-1} (+), donc probablement du mode d'élongation C=O de la tête polaire des phospholipides [Villalain et Gomez-Fernandez (1992)]. D'ailleurs, la déconvolution de la bande vibrationnelle du groupement C=O d'un mélange DPPC:PA (1:2) faite par Villalain et Gomez-Fernandez (1992) donne des sous-bandes à 1681.1 , 1666.7 , 1657 , 1644.5 et 1631.5 cm^{-1} . Ces nombres d'onde caractérisent aussi certaines structures secondaires de la bande amide I du PSII. La possibilité d'une action de photomodification structurale sur les phospholipides ou sur leur environnement se confirme avec la présence de la bande large à $1226\text{-}1222 \text{ cm}^{-1}$ (-) qui apparaît dans tous les spectres de la **figure 38**. Nous pouvons l'attribuer probablement au mode de vibration d'élongation asymétrique (PO_2^-) des têtes polaires [Barnett et coll. (1996), Neault et Tajmir-Riahi (1996), Villalain et Gomez-Fernandez (1992), Rath et coll. (1991)].

En se référant aux travaux de Noguchi et coll. (1993), Sato et coll. (1995) ainsi que d'Okada et coll. (1993), nous pourrions aussi envisager la variation d'intensité à $1695\text{-}1697$

cm^{-1} comme résultant d'une interaction des photons UV avec le mode d'élongation C=O du groupement cétone dans le noyau V du macrocycle des pigments chlorophylliens plutôt qu'avec celui de la fonction amide I. La présence des bandes à 1695 cm^{-1} (-) (**figure 38a**) et 1697 cm^{-1} (-), 1652 cm^{-1} (-) (**figure 38b**) peut suggérer une interaction des quinones, spécifiquement du groupement fonctionnel C=O de la 9-cétone de Q_A et Q_B [Hienerwadel et coll. (1992)] avec ces photons UV-C. Puisqu'aucune baisse d'intensité n'est observée à 1645 cm^{-1} et 1630 cm^{-1} : bandes caractéristiques des quinones [Berthomieu et coll. (1990), Noguchi et coll. (1992)], alors la possibilité d'une photomodification des quinones peut-être considérée comme nulle. Ce résultat constitue une démonstration de l'hypothèse émise au **Chapitre IV**, laquelle exclut l'implication des quinones dans la photoinactivation des fragments membranaires de PSII par les radiations UV utilisées dans ce travail.

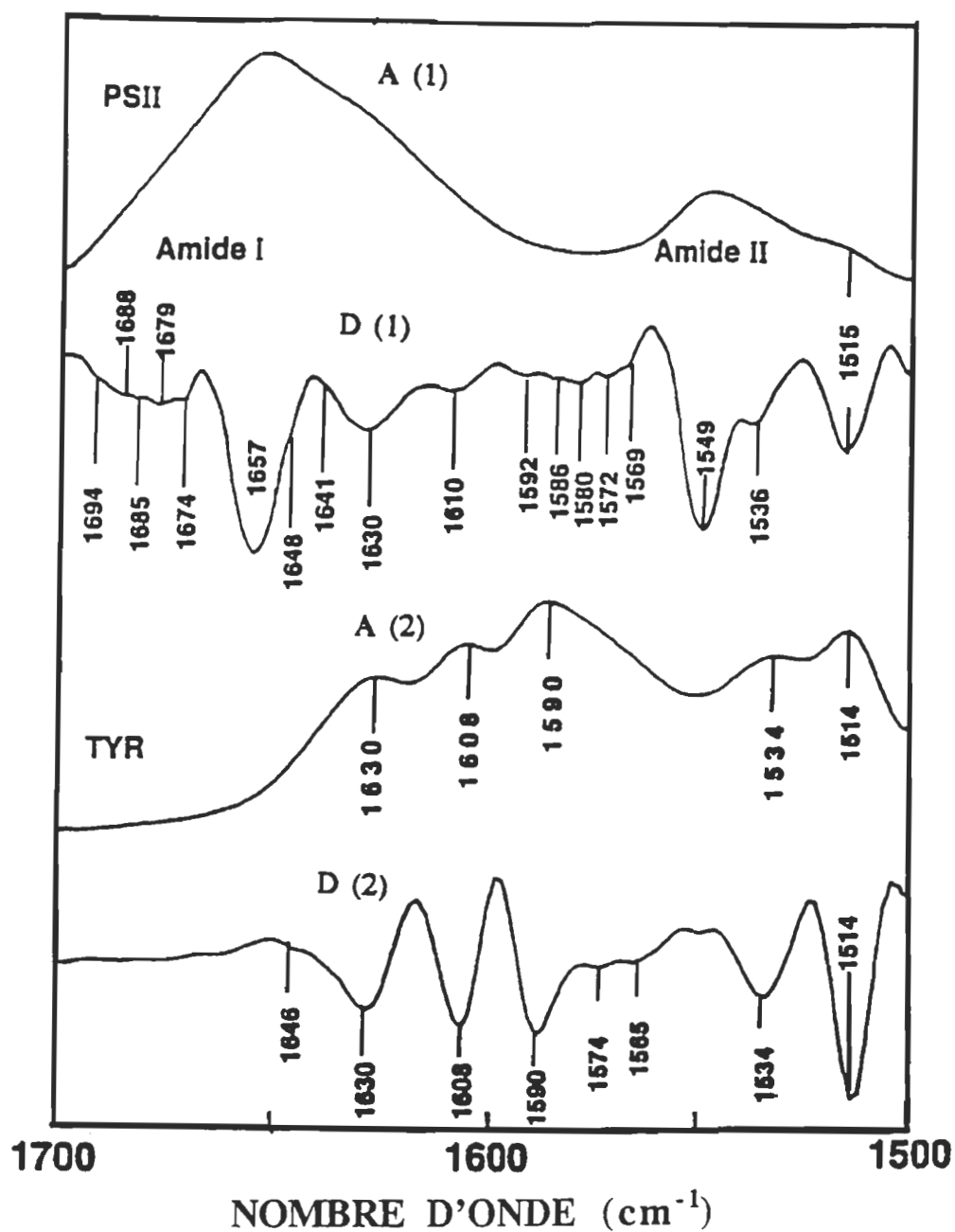


Figure 39. Spectres FTIR de PSII [A(1)] et de la tyrosine libre [A(2)] dans la région de 1700-1500 cm^{-1} . D (1) et D (2) représentent respectivement la dérivée seconde des spectres A (1) et A (2). A signifie absorbance.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Dans ce travail nous avons étudié les effets de faibles doses de radiations monochromatiques UV (280, 226 et 204 nm) sur la structure et le fonctionnement des fragments membranaires de photosystème II des chloroplastes d'orge. Les radiations UV exercent une action délétère sur ces deux aspects en induisant de multitudes changements dans ce complexe macromoléculaire. Cette action nuisible se traduit par la photo-inhibition irréversible de l'activité de transfert d'électrons exprimée sous forme de dégagement d'oxygène en présence de DCBQ et de réduction de DCIP ainsi que par le déclin de la concentration en pigments photosynthétiques et en protéines. Les résultats sont en accord avec ceux de Melis et coll. (1992), Renger et coll. (1989), Greenberg et coll. (1989) ainsi que ceux de Strid et coll. (1990) même si ces auteurs ont travaillé avec des intensités de lumière UV plus élevées. Ces changements qui s'opèrent de manière progressive sur une période entière d'irradiation reflètent sans doute, et l'hétérogénéité des différentes populations de PSII, et l'hétérosensibilité des cibles moléculaires dans le complexe de PSII. Au niveau fondamental, la photo-inactivation progressive des particules de PSII observée en présence de DCBQ et DCIP a permis de prouver que ces deux accepteurs exogènes d'électrons ne suivent pas le même mécanisme de réduction à la face stromale du PSII. Les résultats non seulement confirment l'hypothèse de Purcell et Carpentier (1993), mais aussi nous permettent de considérer le côté accepteur comme une cible importante des radiations UV.

L'effet des radiations UV sur la structure montre que l'ampleur et le type de photodommage dépend de la nature de l'échantillon irradié (PSII en solution ou en film

séché au courant d'azote gazeux). Pour des raisons qui ne sont pas encore claires, la protéolyse semble plus lente dans les films séchés qu'au niveau des échantillons aqueux. Par exemple, les différences de spectres infrarouges permettent de constater que les changements induits dans les structures secondaires des protéines sont très négligeables pour une exposition d'environ 90 min à 280 nm ($2.0 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$). En dépit de la photo-inactivation avancée, aucune variation d'absorbance importante n'a été enregistrée au niveau des protéines (électrophorèse) et des pigments photosynthétiques (spectroscopie UV-visible) suite à l'irradiation pendant 45-90 min à 226 et 204 nm des fragments membranaires de PSII. Bien que nous notons des changements perceptibles sur ces composantes moléculaires à 280 nm, leur ampleur demeure toutefois faible par rapport à l'amplitude de photo-inhibition.

En ce qui concerne les protéines, la diminution en intensité des pics observée par électrophorèse peut probablement indiquer la possibilité d'une photodégradation ou photorupture de la liaison peptidique initiée par la photochimie directe ou indirecte des radicaux d'acides aminés aromatiques tels que le tryptophane et la tyrosine. À ce chapitre, une étude approfondie devrait être menée afin d'élucider les mécanismes photoréactionnels impliquant ces motifs d'acides aminés aromatiques. La diminution de la concentration en polypeptide de 33 kDa par rapport à celle de 23 kDa nous ramène à la situation conflictuelle de la disposition des protéines extrinsèques à la face lumenale du PSII. Les résultats sont, non seulement en accord avec ceux de Bernier et Carpentier (1995), mais aussi favorisent l'arrangement des protéines extrinsèques proposé par Dau (1994) ainsi que Murata et Miyao (1989). Les raisons de la photomodification plus rapide de la protéine D2 par rapport à la D1 ne sont pas encore connues. Ces résultats contredisent apparemment les données de Frisco et coll. (1995), Trebst et Depka (1990) ainsi que Greenberg et coll. (1989) qui ont observé une photodégradation plus importante de la protéine D1. Nous pensons que la

divergence dans les résultats peut être reliée à l'utilisation de doses élevées de rayonnement UV par ces auteurs, lesquelles minimisent l'importance des réactions indirectes. Rappelons que les polypeptides D1 et D2 constituent le noyau actif du PSII. Elles sont les principales protéines qui se lient et soutiennent le centre de Mn. Un changement structural au niveau de ces protéines affectera de manière substantielle la conformation de liaison et la fonction de ce complexe d'oxydation de l'eau, par conséquent l'intégrité fonctionnelle du PSII. Ainsi, la baisse en intensité enregistrée tant au niveau des pics (en électrophorèse) protéines extrinsèques que des polypeptides D1 et D2 nous permet d'envisager le centre réactionnel et le côté donneur comme d'autres cibles des radiations UV.

Quant au niveau des pigments photosynthétiques, la diminution en absorbance est interprétée sous forme de photoblanchiment. Le photoblanchiment accéléré des molécules de Chl a et de caroténoïdes par rapport à celles de Chl b et de Phé corroborent les résultats de Strid et coll. (1990). Le fait que la différence des spectres électroniques suive approximativement le profil de celui enregistré à $t_{ir} = 0$ min (spectre de PSII natif) pourrait constituer une indication de la photo-oxydation homogène des pigments dans les antennes collectrices des photons. Ainsi, la photo-inactivation des particules pourrait être d'une autre manière attribuée à l'incapacité de ces pigments photo-oxydés à assumer le transfert d'excitons jusqu'au centre photochimique du PSII [Sinclair et coll. (1996)]. Cette hypothèse nous amène à considérer aussi les complexes pigment-protéines dans les antennes comme des cibles de ces faibles doses radiations UV. D'un autre côté, en vertu de leur photodégradation rapide (par rapport aux autres pigments), une absorption directe des radiations UV par les molécules Chl a va probablement désorganiser le centre réactionnel du PSII et contribuer à l'inactivation de la particule de PSII.

Cette démarche d'identification des cibles des radiations UV dans le PSII s'inscrit dans une vision plus large que celle des groupes de Melis et coll. (1992) ainsi que de Renger et coll. (1989). Rappelons que selon Melis et coll. (1992), le site de Q_A est la cible privilégiée de la radiation UV (320-280 nm) alors que Renger et coll. (1989) prétendent que c'est le centre manganèse. Nous pensons que le grand nombre de chromophores absorbant dans cette plage de longueurs d'onde de 40 nm (320-280 nm) pourrait rendre difficile l'identification d'une manière absolue de la cible primaire des radiations UV-B dans le PSII en travaillant dans de telles conditions. Ainsi, pour régler cette question de cible (s) primaire (s), la démarche scientifique devrait se faire de prime abord au niveau de la localisation du (des) photorécepteur (s) des photons UV-B et UV-C dans le PSII.

D'une façon globale, la perte en absorbance vue comme une diminution de la concentration en protéines et en pigments photosynthétiques suit une cinétique plus lente que la perte de l'intégrité fonctionnelle. Ce résultat vient appuyer ceux rapportés par Renger et coll. (1989). Alors, dans nos conditions expérimentales, la photo-inhibition de la fonction des particules se présente comme un événement précédant le processus de photodégradation des structures. De plus, les mesures en FTIR des effets spécifiques des photons UV sur les films de PSII (figure 38) laissent entrevoir la possibilité de changement conformationnel (photomodification des liaisons moléculaires, angles de liaison) dont la conséquence serait l'affaiblissement des forces de cohésion entre les différentes sous-unités du PSII. C'est probablement ce phénomène de changement conformationnel qui précède la photodégradation (résultat possible d'une longue période d'irradiation).

Les variations d'intensité (différences spectrales) et de position (dérivée seconde) des bandes de vibration prouvent une forte implication du mode d'élongation C=O dans les interactions des particules de PSII avec les rayons UV. Malheureusement cette observation

ne nous permet pas d'identifier avec certitude les molécules auxquelles peut appartenir ce groupement carbonyle. De plus, la photomodification sélective des fonctions amides I et II semble dépendre des longueurs d'onde d'irradiation. Les raisons de cette sélectivité ne sont pas encore claires. Cependant, nous pensons qu'une des raisons possibles pourrait être le fait que les deux bandes de vibration amide I (1657 cm^{-1}) et amide II (1548 cm^{-1}) ne possèdent probablement pas la même distribution en structures secondaires protéiniques.

Finalement, mentionnons que nos études menées tant au niveau fonctionnel que structural du PSII montrent que les photodommages varient avec l'intensité de lumière UV et le temps d'irradiation. Cela signifie que toute modification du spectre solaire conduisant à une hausse substantielle du flux de photons UV à la surface de la terre aurait un impact dévastateur sur les écosystèmes terrestre et aquatique. Une apparence de ce phénomène est observée sous les tropiques, ou en été dans les régions subpolaires de la planète, où l'ensoleillement intense provoque une hausse de la quantité journalière de rayonnement ultraviolet-B [Bornman (1991)]. Cela cause dans un court laps de temps des dommages considérables tant au niveau des végétaux que des animaux. Afin d'éviter de véritables catastrophes, il s'avère impératif de se pencher sérieusement sur l'élimination des polluants atmosphériques qui sont à l'origine du dépérissement de la couche d'ozone stratosphérique. Comme autre mise en garde, il faudrait redouter l'exposition répétitive (des effets d'accumulation) aux faibles doses de rayonnement UV, car elles peuvent causer autant de dommages que les hautes intensités comme nous l'avons montré dans ce travail. Les détails sur les effets d'accumulation provoqués par l'exposition répétitive aux faibles flux de photons UV sont présentés dans les travaux de Lavker et coll. (1995a, 1995b).

CHAPITRE VII

BIBLIOGRAPHIE

Adamse, P. & Britz, S. J. (1992) Amelioration of UV-B damage under high irradiance. I: role of photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 56: 645-650.

Adamse, P.; Britz, S. J. & Caldwell, R. C. (1994) Amelioration of UV-B damage under high irradiance. II: role of blue light photoreceptors. *Photochem. Photobiol.* 60: 110-115.

Ahmad, S. I. (1981) Synergistic action of near ultraviolet radiation and hydrogen peroxide on the killing of coliphage T7: possible role of superoxide radicals. *Photobiochem. Photobiophys.* 2: 173-180.

Ahmed, A.; Tajmir-Riahi, H. A. & Carpentier, R. (1995) A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of the photosystem II by FTIR spectroscopy. *FEBS Lett.*, 363: 65-68.

Allakhverdiev, S. I.; Ahmed, A.; Tajmir-Riahi, H-A, Klimov, V. V. & Carpentier, R. (1994) Light-induced Fourier transform infrared spectrum of the cation radical P680⁺. *FEBS Lett.* 339: 151-154.

Albertsson, P.-A.; Yu, S.-G. & Larsson, U. K. (1990) Heterogeneity in photosystem II α . Evidence from fluorescence and gel electrophoresis experiments. *Biochim. Biophys. Acta* 1016: 137-140.

Allen, J. F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335.

Altmann, K.I., Gerber, G.B. & Okada, S. (1970) *Radiation Biology*, vol I, Cells, pp 331-336. Academic Press, New-York & London.

Andersson, B. & Styring, S. (1991) Photosystem II – molecular organization, function, and acclimation. Dans: Lee CP (ed) Current Topics in Bioenergetics, vol 16: pp 1-81. Academic Press, San Diego.

Aro, E-M.; Virgin, I. & Andersson, B. (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.

Arrondo, J. L. R.; Young, N. M. & Manstch, H. H. (1988) The solution structure of concanavalin A probed by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 952: 261-268.

Babcock, G. T.; Barry, B. A.; Debus, R. J., Hoganson, C.W., Atamian, M.; McIntosh, L.; Sithole, I. & Yocum, C. F. (1989) Water oxidation in photosystem II: from radical chemistry to multielectron chemistry. *Biochemistry* 28: 9557-9565.

Barbato, R.; Frizzo, A.; Frisco, G.; Rigoni, F. & Giacometti, G. M. (1995) Degradation of the D1 protein of photosystem II reaction centre by ultraviolet radiation requires the presence of functional manganese on the donor side. *Eur. J. Biochem.* 227: 723-729.

Barber, J. & Anderson, B. (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 61-66.

Barnett, M. S.; Dracheva, S.; Hendler, W. R. & Levin, I. W. (1996) Lipid-induced conformational changes of an integral membrane protein: an infrared spectroscopic study of the effects of triton X-100 treatment on the purple membrane of halobacterium ET1001. *Biochemistry* 35: 4558-4567.

Barry, A. B. & Babcock, T. G. (1987) Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl Acad. Sci.* 84: 7099-7103.

Bassi, R.; Rigoni, F. & Giacometti, G. M. (1990) Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Phochem. Photobiol.* 52: 1187-1206.

- Bernier, M. & Carpentier, R. (1995) The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett.* 360: 251-254.
- Berthold, D. A., Babcock, G. T. & Yocum, C. F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylacoid membranes. *FEBS Lett.* 134: 231-234.
- Berthomieu, C.; Navedryk, E.; Mäntele W. & Breton, J. (1990), Characterization by FTIR spectroscopy of photoreduction of the primary quinone acceptor Q_A in photosystem II. *FEBS Lett.* 269: 363-367.
- Black, M. T.; Brearley, T. H. & Horton P. (1986) Heterogeneity in chloroplast photosystem II. *Photosynth. Res.* 89: 193-207.
- Bograh, A.; Gingras, Y.; Tajmir-Riahi, H. A. & Carpentier, R. (1997) The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport. *FEBS Lett.* 402: 41-44.
- Boekema, E. J.; Hankamer, B.; Bald, D.; Kruip, J.; Nield, J.; Boonstra, A. F.; Barber, J. & Rögner, M. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 175-179.
- Booth, P. J.; Crystall, B.; Giorgi, L. B.; Barber, J.; Klug, D. R. & Porter, G. (1990) Thermodynamic properties of D1/D2/cytochrome b-559 reaction centres investigated by time-resolved fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 1016: 141-152.
- Bornman, J. F. (1986) Inhibition of photosystem II by blue light and ultraviolet radiation: a comparison. *Photochem. Photobiophys.* 11: 9-17.
- Bornman, J. F. (1989) Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plant. *J. Photochem. Photobiol. B.* 4: 145-158.

Bornman, J. F. (1991) UV-radiation as an environmental stress in plant. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 8: 337-342.

Bornman, J. F.; Björn, L. O. & Akerlund, H.-E. (1984) Action spectrum for the inhibition by ultraviolet radiation of photosystem II activity in spinach thylakoids. *Photobiochem. Photobiophys.* 8: 305-313.

Bose, B. & Chatterjee, S. N. (1994) UV-A induced peroxidation of lipid in the dried film state. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 23: 119-123.

Bowes, B. G. (1996) A color atlas of plant structure. Iowa State University Press/Amess, pp 42.

Brazhnikov, E. V., Chetverin, A. B. & Chirgadze, Y. N. (1978) Secondary structure of Na⁺, K⁺-dependent Adenosine trisphosphatase. *FEBS Lett.* 93: 125-128.

Brettel, K.; Schlodder, E. & Witt, H. T. (1984) Nanosecond reduction kinetics of the photooxidized chlorophyll-a_{II} (P-680) in single flashes as a probe for the electron pathway, H⁺-release and charge accumulation in the O₂-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 403-415.

Briggs, W. R. (1989) Photosynthesis: plant biology. 8: Liss, R. Alan., Inc., New York.

Brudvig, G. W. & Crabtree, R. H. (1986) Mechanism for photosystem II for photosynthetic O₂ evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4586-4588.

Carpenter, S. D. & Vermaas, J. F. (1989) Directed mutagenesis to probe the structure and function of photosystem II. *Physiol. Plant.* 77: 436-443.

Carpentier, R.; Leblanc, R. M. & Bellemare, G. (1986) Chlorophyll photobleaching in pigment-protein complexes. *Z. Naturforsch* 41c: 284-290.

Carpentier, R.; Leblanc, R. M. & Mimeault, M. (1987) Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylakoid membranes. *Enzyme Microb. Technol.* 78: 724-729.

Caughey, W. B.; Dong, A.; Bahat, S. K.; Ernst, D.; Hayes, F. S. & Caughey, S. W. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein Prp 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30: 7672-7680.

Chapados, C.; Lemieux, S. & Carpentier, R. (1991) Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. *Biophys. Chem.* 39: 225-239.

Chapman, D. J.; Vass, I. & Barber, J. (1991) Secondary electron transfer reactions of the isolated photosystem reaction centre after reconstitution with plastoquinone-9 and diacylglycerolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1057: 391-398.

Chavanne, M.; Jullien, A.; Beaudoin, G. J. & Flamand, E. (1987) Chimie organique expérimentale. Dia, Modulo Belin, pp 357-361.

Chua, N-H. (1980) Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. *Meth Enzymol.* 69: 434-446.

Colthup, N. B.; Daly, L. H. & Wiberley, S. E. (1990) Introduction to infrared and Raman spectroscopy. Academic Press Inc., Boston.

Costes, C. (1978) Photosynthèse et production végétale. Gauthier-Villars, Bordas, Paris.

Craggs, J.; Kirk, S. H. & Ahmad, S. I. (1994) Synergistic action of near-UV and phenylalanine, tyrosine or tryptophan on the inactivation of phage T7: role of superoxide radicals and hydrogen peroxide. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 24: 123-128.

Cullen, J. J. & Lesser, M. P. (1991) Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as function of dose and dosage rate: results for marine diatom. *Mar. Biol.* 111: 183-190.

- Damoder, R.; Klimov, V. V. & Dismukes, C. G. (1986) The effect of depletion and X-reconstitution on the oxygen-evolution rate, the yield of multiline manganese EPR signal and EPR signal II in the isolated photosystem-II complex. *Biochim. Biophys. Acta* 848: 378-391.
- Dau, H. (1994) Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 26: 3-27.
- De Las Rivas, J. & Barber, J. (1997) Structure and thermal stability of photosystem II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 36: 8897-8903.
- Debus, R. J. (1992) The manganese and the calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 269-352.
- Dekker, J. P.; Betts, S. D.; Yocum, C. F. & Boekema, E. J. (1990) Characterization by electron microscopy of isolated particles and two-dimensional crystals of CP47-D1-D2-cytochrome b-559 complex. *Biochemistry* 29: 3220-3225.
- Dekker, J. P.; Van Gorkom, H. J.; Brok, M. & Ouwehand, L. (1984) Optical characterization of photosystem II electron donors. *Biochim. Biophys. Acta* 764: 301-309.
- Dekker, J. P.; Van Gorkom, H. J.; Wensink, J. & Ouwehand, L. (1984) Absorbance difference spectra of the successive redox states of the oxygen-evolving apparatus of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 1-9.
- Delieu, T. & Walker, D. A. (1972) An improved cathode for the measurement of the photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.* 71: 201-225.
- Delrieu, M. J. (1995) A two-electron reaction at the catalytic site of water oxidation in manganese-depleted photosystem II vesicles in the presence of an electron donor. Coupled electron and proton transfer processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1231: 47-57.

Demeter, S.; Neale, P. J. & Melis, A. (1987) Photoinhibition: impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts. *FEBS Lett.* 214: 370-374.

Deming-Adams, B. & Adams III, W. W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.

Desai, T. S. (1990) Studies on thermoluminescence, delayed light emission and oxygen evolution from photosynthetic materials: UV effects. *Photosynth. Res.* 25: 17-24.

Dodonova, Y. N. (1993) Vacuum UV - photophysics and photochemistry of biomolecules. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 18: 111-121.

Dong, A.; Huang, P. & Caughey, S. W. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29: 3303-3308.

Dousseau, F. & Pézolet M. (1990) Determination of the secondary structure content proteins in aqueous solutions from their amide I and Amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry* 29: 8771-8779.

Eaton-Rye, J. J. & Murata, N. (1989) Evidence that the amino-terminus of the 33 kDa extrinsic protein is required for the binding to the photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta* 977: 219-226.

Eckert, H.-J.; Wiese, N.; Bernarding, J.; Eichler, H.-J. & Renger, G. (1988) Analysis of the electron transfer from Pheo⁻ to QA in PSII membrane fragments from spinach by time resolved 325 nm absorption changes in the picosecond domain. *FEBS Lett.* 240: 153-158.

Eijkelhoff, C. & Dekker, J. P. (1995) Determination of the pigment stoichiometry of the photochemical reaction center of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1231: 21-28.

Farman, J. C.; Gardiner, B. G. & Shanklin J. D. (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature* 315: 207-210.

Ferraro, J. R. & Krishnan, K. (1990) *Practical Fourier transform infrared spectroscopy: industrial and laboratory chemical analysis*. Academic Press Inc., San Diego.

Foyer, C. H. (1984) *Photosynthesis*. John Wiley and Sons Inc., New York.

Fragata, M. (1991) Resolved Q_X and Q_Y electronic transitions in chlorophyll *a*. *Light in Biology and Medicine* 2. Plenum Press, New York.

Fragata, M.; Nordin, B. & Kurucsev, T. (1988) Linear dichroism (250-700 nm) of chlorophyll *a* and pheophytin *a* oriented in lamellar phase of glycerylmonooctanoate / H₂O. Characterization of electronic transitions. *Photochem. Photobiol.* 47: 133-143.

Frederick, J. E., Snell, H. E. & Haywood, E. K. (1989) Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem. Photobiol.* 50: 443-450.

Frisco, G.; Giacometti, M. G. & Barber, J. (1993) Evidence for concurrent donor and acceptor side photoinduced degradation of the D1-protein in isolated reaction centres of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 265-270.

Frisco, G.; Spetea, C.; Giacometti, M. G.; Vass, I. & Barbato, R. (1994) Degradation of photosystem II reaction center D1-protein induced by UV-B radiation in isolated thylakoids. Identification and characterization of C- and N-terminal breakdown products. *Biochim. Biophys. Acta* 1184: 78-84.

Frisco, G.; Vass, I.; Spetea, C.; Barger, J. & Barbato, R. (1995) UV-B induced degradation of the D1 protein in isolated reaction centers of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1231, 41-46.

Gabashvili, I. S.; Menikh, A.; Ségui, J. & Fragata, M. (1998) Protein structure of photosystem II studied by FT-IR spectroscopy. Effect of digalactosyldiacylglycerol on the tyrosine side chain residues. *J. Mol. Struct.* 444, 123-133.

Gala, R. W. & Giesy, J. P. (1991) Effects of ultraviolet radiation on the primary production of natural phytoplankton in the Lake Michigan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22: 345-361.

George, B. & McIntyre, P. (1987) *Infrared spectroscopy: analytical chemistry by open learning*. John Wiley and Sons Chichester.

Ghanotakis, D. F. & Yocum, C. F (1985) Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. *Photosynth. Res.* 7: 97-114.

Ghanotakis, D.; Topper, J.; Babcock, G. & Yocum, C. (1984) Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. *FEBS Lett.* 167: 127-130.

Gerken, S.; Brettel, K.; Scholder, E. & Witt, H. T. (1988) Optical characterization of immediate electron donor to chlorophyll a_{II}^+ in O_2 -evolving photosystem II particles. *FEBS Lett.* 237: 69-75.

Ghirardi, M. L. & Melis, A. (1988) Chlorophyll *b*-deficiency in soybean mutants. I. Effects on photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Biochim. Biophys. Acta.* 932: 130-137.

Gobets, B.; van Amerongen, H.; Monshouwer, R.; Kruip, J.; Rögner, H.; van Grondelle, R. & Dekker, J. P. (1994) Polarized site-selected fluorescence spectroscopy of isolated photosystem I particles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1188: 75-85.

Godde, D.; Buchhold, J.; Ebbert, V. & Oettmeier, W. (1992) Photoinhibition in intact spinach plants: effect of high light intensities on the function of the two photosystems and the content of the protein under nitrogen. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 69-77.

Gounaris, K.; Chapman, D. J.; Booth, P.; Crystall, B.; Giorgi, L. B.; Klug, D. R.; Porter, G. & Barber, J. (1990) Comparison of the D1-D2-cytochrome b-559 reaction centre complex of photosystem two isolated by two different methods. *FEBS Lett.* 265: 88-92.

Govindjee & Coleman, W. (1990) La production d'oxygène par les plantes. *Pour La Science* 150: 42-49.

Greene, B. A.; Staehelin, L. A. & Melis, A. (1988) Compensatory alterations in the photochemical apparatus of a photoregulatory chlorophyll *b*-deficient mutant of maize. *Plant Physiol.* 87: 365-370.

Greenberg, B. M.; Gaba, V.; Mattoo, A. K. & Edelman, M. (1989) Degradation of the 32 kDa photosystem II reaction center protein in UV, Visible and far red light occurs through a common 23.5 kDa intermediate. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 44c: 450-452.

Greenstock, C. L. & Miller, R. W. (1975) The oxidation of tiron by superoxide anion. Kinetics of the reaction in aqueous solution and in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 396: 11-16.

Gregory, R. P. (1989) *Biochemistry of photosynthesis*. 3^{ème} éd. John Wiley and Sons Inc., Chichester, New York.

Griffiths, P. R. & de Haseth, J. A. (1986) *Fourier transform infrared spectrometry*. 83: John Wiley and Sons, New York.

Guenther, J. E. & Melis, A. (1990) The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. *Photosynth. Res.* 23: 105-109.

Haag, E.; Irrgang, K. D.; Boekema, E. J. & Renger, G. (1990) Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. *Eur. J. Biochem.* 189: 47-53.

Hada, M.; Tada, M. & Hashimoto, T. (1993) UV-B induced absorbance changes in the yeast *rhodotorula minuta*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 17: 127-134.

Häder, D.-P. & Tevini, M. (1987) *General photobiology*. Pergamon Press, Oxford, New York.

Hall, D. O. & Rao, K. K. (1972) *Photosynthesis*. The Institute of Studies in Biology. 37: Edward Arnold, London.

Hallahan, B. J.; Ruffle, S. V.; Bowden, S. J. & Nugent, J. H. A. (1991) Identification and characterization of EPR signals involving Q_B semiquinone in plant photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1059: 181-188.

Halverson, K.; Fraser, P. E.; Kirschner, D. A. & Lansbury, P. T., Jr. (1990) Molecular determinants of amyloid deposition in Alzheimer's disease: conformational studies of synthetic β -protein fragments. *Biochemistry* 29: 2639-2644.

Hansen, U.-P.; Dau, H.; Brünning, B.; Fritsch, T. & Moldaenke, C. (1991) Linear analysis applied to the comparative study of the I-D-P phase of the chlorophyll fluorescence as induced by actinic PSII-light, PSI light and changes in CO_2 concentration. *Photosynth. Res.* 28: 119-190.

Hansson, Ö. & Wydrynski, T. (1990) Current perceptions of photosystem II. *Photosynth. Res.* 23: 131-162.

Haris, I. P. Lee, D. C. & Chapman, D. (1986) A Fourier transform infrared investigation of the structural differences between ribonuclease A and ribonuclease S. *Biophys. Acta* 874: 255-265.

Haris, I. P.; Robillard, G. T.; van Dijk, A. A. & Chapman, D. (1992) Potential of ^{13}C and ^{14}N labeling for studying protein-protein interactions using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 31: 6279-6284.

Hashimoto, A.; Akasada, T. & Yamamoto, Y. (1993) Characteristics of the assembly of the 33 kDa oxygen-evolving complex protein in the etioplasts and the developing chloroplasts of barley seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 1183: 397-407.

He, W.-Z.; Newell, R. W.; Harris, P. I.; Chapman, D. & Barber, J. (1991) Protein secondary structure of isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30: 4552-4559.

Helbling, W. E.; Villafane, V.; Ferrario, M. & Holm-Hansen, O. (1992) Impact of the natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 80: 89-100.

Hienerwadel, R.; Thibodeau, D.; Lenz, F.; Navedryk, E.; Breton, J.; Kreutz, W. & Mäntele, W. (1992) Time-resolved infrared spectroscopy of electron transfer in bacterial photosynthetic reaction centers: dynamics of binding and interaction upon Q_A et Q_B reduction. *Biochemistry* 31: 5799-5608.

Hoganson, C. W. & Babcock, G. T. (1988) Electron-transfer events near the reaction center in O_2 -evolving photosystem II preparations. *Biochemistry* 27: 5848-5855.

Holden, M. (1976) Chlorophylls. Dans: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments* (Goodwin, T, ed.). 2nd ed. Academic Press, London: 1-37.

Holzbaur, E. I.; English, A. M. & Ismail, A. A. (1996) FTIR study of the thermal denaturation of horseradish and cytochrome c peroxidases in D_2O . *Biochemistry* 35: 5488-5494.

Holzenburg, A.; Bewley, M. C.; Wilson, F. H.; Nicholson, W. V. & Ford, R. C. (1993) Three-dimensional structure of the photosystem II. *Nature* 363: 470-472.

Ikeuchi, M. & Inoue, Y. (1986) Characterization of evolution by a wheat photosystem II reaction center isolated by simplified method: disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca^{2+} demand. *Arch. Biochem. and Biophys* 247: 97-107.

Iwaki, M.; Mimuro, M. & Itoh, S. (1992) Fluorescence of P700 and antenna chlorophylls in photosystem I particles that contain 11 chlorophylls/P700. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 278-284.

Iwanzik, W.; Tevini, M.; Dohnt, G.; Voss, M.; Weiss, M.; Gräber, P. & Renger, G. (1983) Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 58: 401-407.

Jegerschöld, C. & Styring, S. (1991) Fast oxygen-independent degradation of the D1 reaction center protein in photosystem II. *FEBS Lett.* 280: 87-90.

Jegerschöld, C.; Virgin, I. & Styring, S. (1990) Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry* 29: 6179-6186.

Jirgensons, B. (1973) *Molecular biology, biochemistry and biophysics 5: optical activity of proteins and other macromolecules.* 2nd ed., Springer-Verlag, New-York.

Jokela, K.; Leszczynski, K.; Visuri, R. & Yliantila, L. (1995) Increased UV exposure in Finland in 1993. *Photochem. Photobiol.* 62: 101-107.

Kulandaivelu, G.; Maragatham, S. & Nedunchezian, N. (1989) On the possible control of ultraviolet-B induced response in growth and photosynthetic. *Physiol. Plant.* 76: 398-404.

Kulandaivelu, G. S. & Noorudeen, A. M. (1983) Comparative study of the action of ultraviolet-C and ultraviolet-B radiation on photosynthetic electron transport. *Physiol. Plant.* 58: 389-394.

Kirilovsky, D. & Etinne, A-L. (1991) Protection of the reaction center II from photodamage by low temperature and anaerobiosis in spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 279: 201-204.

Klimov, V. V.; Klevanik, A. V.; Shuvalov, V. A. & Krasnovsky, A. A. (1978) Dans: *Photosynthetic Oxygen Evolution*. Academic Press, London: 47-155.

Kobayashi, M.; Maeda, H.; Watanabe, T.; Nakane, H. & Satoh, K. (1990) Chlorophyll *a* et β -carotene content in the D1/D2/cytochrome b-559 reaction center complex from spinach. *FEBS Lett.* 260: 138-140.

Kohen, E.; Santus, R. & Hirschberg, J. G. (1995) *Photobiology*. Academic Press, San Diego.

Kossovsky, N.; Nguyen, A.; Sukiassans, K.; Festekjian, A.; Gelman, A. and Sponsler, E. (1994) Secondary structure of albumin acquired rapidly by modified conventional ATR-FTIR is comparable to CD spectral data. *J. Colloid Interface Sci.* 166: 350-355.

Kretschmann, H.; Dekker, J. P.; Sayin, Ö. & Witt, H. T. (1988) An agreement on the quaternary oscillation of the ultraviolet absorption changes accompanying the water splitting in the isolated photosystem II complexes from the cyanobacterium *synechococcus* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 932: 358-361.

Kretschmann, H. & Witt, H. T. (1993) Chemical reduction of the water splitting enzyme system of the photosynthesis and its light-induced reoxidation characterized by optical and mass spectrometric measurements: A basis for the estimation of the redox active manganese and water in the quaternary oxygen-evolving S-state cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 331-345.

Krimm, S. & Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. Dans: *Advances in Protein Chemistry* (Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T. and Richards, F. M.). Academic Press Inc., Orlando. 38: 181-364.

Krinsky, N. I (1978) Non-photosynthetic functions of carotenoids. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 284: 581-590.

Kühlbrandt, W.; Wang, D. N. & Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant of light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621.

Lavergne, J. (1987) Optical difference spectra of the S-state transitions in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Biophys. Biochim. Acta* 894: 91-107.

Lavergne, J (1986) Stoichiometry of the redox changes of manganese during the photosynthetic oxygen-evolving complex cycle. *Photochem. Photobiol.* 43: 311-317.

Lavker, R. M.; Gerberick, G. F.; Veres, D. A.; Irvin, C. J. & K. H. Kaidbey (1995) Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses UVB and UVA in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32: 53-62.

Lavker, R. M.; Veres, D. A.; Irvin, C. J. & K. H. Kaidbey (1995) Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. *Photochem. Photobiol.* 62: 348-352.

Lawlor, D. W. (1987) *Photosynthesis: metabolism, control and physiology*. Longman Scientific and Technical, John Wiley and Sons Inc. New York.

Lee, C.-H.; Roelofs, A. T. & Holzwarth, A. R. (1990) Target analysis of picosecond fluorescence kinetics in green algae: characterization of primary processes in photosystem II α and β . *Cur. Res. Photosynth. I*: 387-390.

Lidon, F. C. & Henriques, F. S. (1993) Oxygen metabolism in higher plant chloroplasts. *Photosynthetica* 29: 249-279.

Lin, S.; van Amerongen, H. & Struve, W. S. (1992) Ultrafast pump-probe spectroscopy of the P700 and Fx-containing photosystem I core protein from *synechococcus.sp.* PCC 6301 (*Anacystis indulans*). *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 6-14.

Ludlam, C. F. C.; Sonar, S.; Lee, C.-P.; Coleman, M.; Herzfeld, J.; RajBhandary, U. L. & Rothschild, K. J. (1995) Site-directed isotope labelling and ATR-FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: the peptide carbonyl group of Tyr 185 is structural ly active during Br⁻-N transition. *Biochemistry*, 34: 2-6.

Lyon, K. M.; Marr, M. K. & Furcinitti, S. P. (1993) Formation and characterization of two-dimensional crystals of photosystem II. *J. Struct. Biol.* 110: 133-140.

MacDonald, M. G. & Barry, B. A. (1992) Difference FT-IR study of a novel biochemical preparation of photosystem II. *Biochemistry* 31: 9848-9856.

MacDonald, M. G.; Bixby, A. K. & Barry, B. A. (1993) A difference Fourier-transform infrared study of two-redox-active tyrosine residues in photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11024-11028.

Mackenzie, M. W. (1988) *Advances in applied Fourier transform infrared spectroscopy.* John Wiley and Sons, Chichester.

McFarland, M. & Kaye, J. (1992) Chlorofluorocarbons and ozone. *Photochem. Photobiol.* 55: 911-929.

Macpherson, N. A.; Telfer, A.; Barber, J. & Truscott, G. T. (1993) Direct detection of singlet oxygen from photosystem II reaction centres. *Biochim. Biophys. Acta.* 1143: 301-309.

- Maeda, A.; Sasaki, J.; Yamazaki, Y., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1994) Interaction of aspartate-85 with a water molecule and the protonated Schiff base in the L intermediate of bacteriorhodopsin: a Fourier transform-infrared spectroscopy study. *Biochemistry* 33: 1713-1717.
- Mäntele, W.; Navedryk, E.; Tavitian, B. A.; Kreutz, W. & Breton, J. (1985) Light-induced Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy investigations of the primary donor oxidation in bacterial photosynthesis. *FEBS Lett.* 187: 227-232.
- Mattoo, K. A.; Marder, B. J. & Edelman, M. (1989) Dynamics of the photosystem II reaction center. *Cell.* 56: 1241-246.
- McCornick, J. P.; Fisher, J. R.; Pachlatko, J. P. & Einsenstark, A. (1976) Characterization of the cell-lethal tryptophan photo-oxidation product: hydrogen peroxide. *Science* 191: 468-469.
- Melis, A. & Duysens, L. N. M. (1979) Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of PSII of chloroplasts. Evidence for two different PSII reaction centers. *Photochem. Photobiol.* 29: 373-382.
- Melis, A. & Homann, P. H. (1976) Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 23: 343-350.
- Melis, A.; Nemson, J. A. & Harrison, A. M. (1992) Damage to functionnal components and partial degradation of the photosystem II reaction center proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 312-320.
- Menikh, A. and Fragata, M. (1994) Protein secondary structure of the photosystem II complex studied by FT-IR spectroscopy. Changes in the amide I region mediated by digalactosyldiacylglycerol and divalent ions. *J. Mol. Struct.* 319: 101-107.

Michaeli, M. & Feitelson, J. (1995) Reactivity of singlet oxygen toward large peptides. *Photochem. Photobiol.* 61: 255-260.

Miller, A.-F. & Brudvig, G. W. (1991) A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of the photosystem II membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1056: 1-18.

Miller N. & R. Carpentier (1991) Energy dissipation and photoprotection mechanisms during the chlorophyll photobleaching in thylakoids membranes *Photochem. Photobiol.* 54: 465-472.

Mistoki, S. & Garcia, N. A. (1993) Influence of the peptide bond on the molecular oxygen-mediated ($O_2[{}^1\Delta_g]$) photooxidation of the histidine and methionine dipeptides. A kinetic study. *Photochem. Photobiol.* 57: 447-452.

Mitchell, R. C.; Haris, P. I.; Fallowfield, C.; Keeling, D. J. & Chapman, D. (1988) Fourier transform infrared spectroscopic studies on gastric H⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 941: 31-38.

Miyao, M. & Inoue, Y. (1991) An improved procedure for photoactivation of photosynthetic oxygen evolution: Effect of artificial electron acceptors on the photoactivation yield of the NH₂OH-treated wheat photosystem II membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1056: 47-56.

Molina, M. J. & Rowland, F. S. (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom catalyze destruction of ozone. *Nature* 249: 810-812.

Montoya, G.; Yrelua, I. & Picorel, R. (1991) Pigment stoichiometry of a newly isolated D1-D2-cyt b-559 complex from the higher plant *Beta Vulgaris* L. *FEBS Lett.* 283: 255-258.

Mori, H. & Yamamoto, Y. (1992) Deletion of antenna chlorophyll-a-binding proteins CP43 and CP47 by Tris-treatment of PSII membranes in weak light: Evidence for a photo-degradative effect on the PSII components other than the reaction center-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 293-298.

Mori, H.; Yamashita, Y.; Akasaka, T. & Yamamoto Y. (1995) Further characterization of the loss antenna chlorophyll-binding protein CP43 from photosystem II during donor-side photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1228: 37-42.

Murata, N.; Higashi, S. & Fujimura Y. (1990) Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1019: 261-268.

Murata, N. & Miyao, M. (1985) Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem. Sci.* 10: 122-124.

Murata, N. & Miyao, M. (1987) oxygen-evolving complex of photosystem II in higher plants. Dans: *Progress in Photosynthesis Research*, Biggens, J. (ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht 1: 453-462.

Murata, N. - & Miyao, M. (1989) Photosystem II and oxygen evolution. Dans: *Photosynthesis, Plant Biology*. Briggs, W. R. ; Alan, R.; Liss Inc. New York 8: 59-70.

Murphy, T. M. (1983) Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* 58: 381-388.

Nahar, S.; Tajmir-Riahi, H. A. & Carpentier, R. (1994) A quantitative analysis of protein secondary structure of the photosystem II particles and light-harvesting complex of chloroplast thylacoïd membranes by FT-IR spectroscopy, *J. Mol. Struc.* 328: 115-120.

Neault, J. F. & Tajmir-Riahi, H. A. (1996) Diethylstilbestrol-DNA interaction studied by Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 271: 8140-8143.

Nénonéné, K. E. (1992) Effets du phosphatidylglycerol et des cations mono- et divalents dans la formation et l'activité des complexes lipides-polypeptides du photosystème II. Thèse de doctorat présentée à l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Nielsen, T.; Björn, O. L. & Ekelund, N. G. A. (1995) Impact of natural and artificial UVB radiation on motility and growth of marine dinoflagellates. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 27: 73-79.

Noguchi, T.; Inoue, Y. & Satoh, K. (1993) FT-IR studies on the triplet state of P680 in the photosystem II reaction center triplet equilibrium within a chlorophyll dimer. *Biochemistry*, 32: 7186-7195.

Noguchi, T.; Ono, T. & Inoue, Y. (1995) A carboxylate ligand interacting with water in the oxygen-evolving center of photosystem II as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1232: 59-66.

Noguchi, T.; Ono, T. & Inoue, Y. (1992) Detection of structural changes upon S1-to-S2 transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry*, 31: 5953-5956.

Noorudeen, A. M. & Kulandaivelu, G. (1982) On the possible site of inhibition of the photosynthetic electron transport by ultraviolet-B (UV-B) radiation. *Physiol. Plant.* 35: 161-166.

Nordén, B.; Fragata; M. & Kurucesev, T. (1992) X- and Y-polarized of chlorophyll *a* in the red region: resolution enhancement and gaussian deconvolution. *Aust. J. Chem.* 45: 1559-1570.

Okada, M.; Kitajima, M. & Butler, W. L. (1976) Inhibition of photosystem I and photosystem II in chloroplast by UV radiation. *Plant Cell Physiol.* 17: 35-43.

Okada, K.; Uehara, K. & Ozaki, Y. (1993) Fourier-transform infrared spectroscopy study the structure of the chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in highly dilute water-saturated carbon tetrachloride solutions. *Photochem. Photobiol.* 57: 958-963.

Omata, T.; Murata, N. & Satoh, K. (1984) Quinone and pheophytin in the photosynthetic reaction center II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 765: 403-405.

Pachler, K. G. R.; Matlock, F. & Gremlich, H.-U. (1988) Merck FTIR atlas, A collection of FTIR spectra. Merck Darmstadt.

Panagopoulos, I.; Bornman J. F. & Björn, L. O. (1990) Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 8: 73-87.

Pauly, S. & Witt, H. T. (1992) Are there really four manganese ions per centre of photosynthetic water oxidation? *Biochim. Biophys. Acta* 1099: 211-218.

Park, Y.-I.; Chow, W. C. & Anderson, J. M. (1995) Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* 196: 401-411.

Park, Y.-I.; Chow, W. C.; Barry, C. O. & Anderson, J. M. (1996) Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of photosystem II *in vivo*. *Photosynth. Res.* 50: 23-32.

Peter, G. F. & Thornber, J. P. (1991) Biochemical evidence that the higher plant photosystem II core complex is organized as a dimer. *Plant Cell Physiol.* 32: 1237-1250.

Post, A.; Lukins, P.B.; Walker, P.J. & Larkum, A. W. D. (1996) The effects of ultraviolet irradiation on P680⁺ reduction in PSII core complexes measured for individual S-states and during the repetitive cycling of the oxygen-evolving complex. *Photosynth. Res.* 49: 21-27.

Powles, S. G. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.

Purcell, M. & Carpentier, R. (1993) Alteration of stromal side of photosystem II by diphenylcarbazide. *Plant Science* 94: 55-59.

Rath, P.; Bousché, O.; Merrill, A. R.; Cramer, W.A. & Rothschild, K. J. (1991) Fourier transform infrared evidence for a predominantly alpha-helical structure of the membrane bound channel forming COOH-terminal peptide of colicin E1. *Biophys. J.* 59: 516-522.

Renger, G. (1993) Water cleavage by solar radiation - an inspiring challenge of photosynthesis research. *Photosynth. Res.* 38: 229-247.

Renger, G.; Völker, M.; Eckert, J.; Fromme, R.; Hohm-Veit, S. & Gräber, P. (1989) On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation. *Photochem. Photobiol.* 49: 97-105.

Renger, G.; Rettig, W. & Gräber, P. (1991) The effect of UVB irradiation on the lifetimes of singlet excitons in isolated photosystem II membrane fragments from spinach. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 9: 201-210.

Richter, M.; Rühle, W. & Wild, A. (1990) Studies on the mechanism of the PSII photoinhibition. A two step degradation of D1. *Photosynth. Res.* 24: 229-235.

Robinson, H. H. & Crofts, A. R. (1983) Kinetics of the oxidation-reduction reaction of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation. *FEBS Lett.* 153: 221-226.

Ruban, A. V.; Rees, D.; Pascal, A. A. & Horton, P. (1992b) Mechanism of the ΔpH -dependent dissipation of the absorbed excitation energy by photosynthetic between LCHII aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 39-44.

- Ruban, A. V.; Rees, D.; Pascal, A. A. & Horton, P. (1992a) Mechanism of the ΔpH -dependent dissipation of the absorbed excitation energy by photosynthetic between LCHII aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids. Spectroscopy analysis of isolated light harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 20-30.
- Rutherford, A. W. & Zimmerman, J. L. (1984) A new EPR signal attributed to the primary plastoquinone acceptor on photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 168-175.
- Santini, C.; Tidu, V.; Tognon, G.; Magaldi, G. A. & Bassi, R. (1994) Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization in vivo. *Eur. J. Biochem.* 221: 307-315.
- Sato, H.; Okada, K.; Uehara, K. & Ozaki, Y. (1995) Near-infrared Fourier-transform Raman study of the chlorophyll *a* in solutions. *Photochem. Photobiol.* 61: 175-182.
- Sato, K. (1988) Reality of P-680 chlorophyll protein. Identification of the site of the primary photochemistry in oxygenic photosynthesis. *Physiol. Plant.* 72: 209-212.
- Schatz, G. H.; Brock, H. & Holzwarth, A. R. (1987) Picosecond kinetics of fluorescence and absorbance in photosystem II particles excited at low photon density. *Proc. Natl. Acad. sci. USA* 84: 8414-8418.
- Schreiber, U.; Hormann, H.; Neubauer, C. & Klughammer, C. (1995) Assessment of PSII photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 209-220.
- Scotto, J.; Cotton, G.; Urbach, F.; Berger, D. & Fears, T. (1988) Biologically effective ultraviolet radiation: surface measurements in the United States, 1974-1985. *Science* 239: 762-763.

Searle, G. F. W.; Telfer, A.; Barber, J. & Schaafsma, T. J. (1990) Millesecond time-resolved EPR of spin-polarized triplet in the isolated photosystem II reaction centre. *Biochim. Biophys. Acta.* 1016: 235-243.

Ségui, J. & Fragata, M. (1994) Photoinhibition of oxygen-evolving activity in photosystem II particles mediated by shortwave ultraviolet radiation (280 nm) of low intensity. *Plant. Physiol., Life Sci. Adv.* 13: 321-327.

Senak, L. & Mendelsohn, R. (1993) Infrared spectroscopy study of a "hard-to-exchange" phospholipid population in the vicinity of CaATPase. *Biochemistry* 32: 6288-6294.

Shepanski, J. F.; Williams, D. J. & Kalisky, Y. (1984) The triplet exciton of chlorophyll *a* and carotenoid in solution and in photosynthetic antenna proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 166-125.

Shen, J.-R.; Satoh, K. & Katoh, S. (1988) Isolation of an oxygen-evolving photosystem II preparation containing only one tightly bound calcium atom from a chlorophyll *b*-deficient mutant of rice. *Biochim. Biophys. Acta* 936: 386-394.

Siefermann-Harms, D. (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69: 561-568.

Sinclair, J.; Park, Y.-I.; Chow, W. C. & Anderson, J. M. (1996) Target theory and the photoinhibition of photosystem II. *Photosynth Res.* 50: 33-40.

Smith, J. G., White, M. G. & Ryan, K. G. (1993) Seasonal trends in erythema and carcinogenic ultraviolet radiation at mid-southern latitudes 1989-1991. *Photochem. Photobiol.* 57: 513-517.

Smith, K. C. (1989) *The science of photobiology*. 2ème éd., Plenum Press, New York.

- Smith, R. C.; Baker, K. S.; Holsem-Hansen, O. & Olson, R. (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural waters. *Photochem. Photobiol.* 31: 585-592.
- Smith, R. C.; Prez  lin, B. B.; Baker, K. S.; Bidigare, R. R.; Boucher, N. P.; Coley, T.; Karentz, D.; MacIntyre, S.; Matlick, H. A.; Menzies, D.; Ondrusek, M. Wan, Z. & Waters, K. J. (1992) Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters. *Science* 255: 952-959.
- Sreerama, N.; Powers, M. E.; Manning, M.C.; Goldenberg, D. M. & Woody, R. W. (1998) Tyrosine, phenylalanine and disulfide contributions to the circular dichroism proteins: CD spectra of wild-type and mutant BPTI. *Biophys. J.* 42 nd Annual Meeting of Biophysical Society, Kansas City, Missouri, February 22-26, pp A63.
- Stolarski, R.; Bojkov, R.; Bishop, L.; Zerefos, C.; Staehelin, J. & Zawodny, J. (1992) Measured trends in stratospheric ozone. *Science* 256: 342-349.
- Strid, A.; Chow, W. S. & J. M. Anderson (1990) Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 260-268.
- Svensson, B.; Vass, I.; Cedergren, E. & Styring, S. (1990) Structure of donor side components in photosystem II predicted by computer modelling. *EMBO J.* 9: 2051-2059.
- Svensson, B.; Andreasson, E. & Albertsson, P.-A. (1991) Heterogeneity among photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1060: 45-50.
- Sullivan J. H. & Teramura, A. H. (1989) The effects of ultraviolet-B on loblolly pine. I. Growth, photosynthesis and pigment production in greenhouse-grown seedlings. *Physiol. Plant.* 77: 202-207.
- Takahashi, M. J. Mano & Asada, K. (1990) Functionnal Structure of the oxygen-evolving unit of the photosystem II as determined by radiation inactivation. *Plant Cell Physiol.* 31: 1191-1198.

- Tanaka, S. & Wada, K. (1988) The status of the cysteine residus the 33 kDa protein of the spinach photosystem II complexes. *Photosyn. Res.* 17: 255-266.
- Tang, X. S.; Diner, B. A.; Larsen, B. S.; Gilchrist, L. M. JR.; Lorigan, G. A. & Britt, D. R. (1994) Identification of histidine at the catalytic site of the photosynthetic oxygen-evolving. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91: 704-708.
- Tang, X. S.; Fushini, K. & Satoh, K. (1990) D1-D2 complex of the photosystem II reaction center from spinach: Isolation and partial characterization. *FEBS Lett.* 273: 257-260.
- Tavitian, B. A.; Nabedryk, W.; Mäntele, W. & Breton, J. (1986) Light-induced transform infrared (FTIR) spectroscopy investigations of primary reactions in photosystem I and photosystem II. *FEBS Lett.* 201: 151-157.
- Teramura, A. (1983) Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.* 58: 415-427.
- Teramura, A. H.; Ziska, L. H. and Sztein, A. E. (1991) Changes in growth and photochemistry capacity of rice with increased UV-B radiation. *Physiol. Plant.* 83: 373-380.
- Teramura, A. H.; Sullivan, J. H. & Ziska, L. H. (1990) Interaction of elevated ultraviolet-B radiation and carbon dioxide on productivity and phosynthetic characteristics in wheat, rice and soybean. *Plant. Physiol.* 94: 470-475.
- Tevini, D. P & Häder, M. (1987) *General Photobiology.* Pergamon. Press, Oxford.
- Tevini, M. & Teramura, A. H. (1989) UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem. Photobiol.* 50: 479-487.
- Trebst, A. & Avron, M. (1977) Photosynthesis I: photosynthetic, electron transfer and photophosphorylation. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 5: Springer-Verlag.*

Trebst, A. & Depka, B. (1990) Degradation of the D-1 protein subunit of photosystem II in isolated thylakoids by UV light. *Z. Naturforsch.* 45c: 765-771.

Trissl, H.-W. & Leibl, W. (1989) Primary charge separation in photosystem II involves two electrogenic steps. *FEBS Lett.* 244: 85-88.

Tu, A. T. (1982) Raman spectroscopy in biology: principles and applications. Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons Inc., New York.

Urbach, F. (1991) Patterns of humans exposure to ultraviolet radiation. *Photobiology*, Plenum Press, New-York, pp 1037-1044.

van der Leun, J. C. (1990) Environmental effects of ozone depletion. *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 8: 113-118.

van Gorkon, H. J.; Thielen, A. P. G. M. & Gorren, A. C. F. (1982) dans *Function of quinones in energy-conserving systems* (Trumpower, B. L., ed.) pp 213-225, Academic Press, New.

van Leeuwen, P. J.; Nieveen, M. C.; van de Meent, E. J.; Dekker, J. P. & Van Gorkom, H. J. (1991) Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center. *Photosynth. Res.* 28: 149-153.

van Wijk, K. J.; Schnettger, B.; Graf, M. & Krause, H. G. (1993) Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1142: 59-68.

Vermaas, W. F. J.; Rtyring, S.; Schröder, W. P. & Andersson, B. (1993) Photosynthetic water oxidation: the protein framework. *Photosynth. Res.* 38: 249-263.

Vermeglio, A.; Breton, J.; Barouch, Y. & Clayton, R. K. (1980) Orientation of the hemes of high potential cytochromes relatives to photosynthetic membranes as shown by the linear dichroism of oriented preparations. *Biochim. Biophys. Acta* 593: 299-311.

- Villalain, J. & Gomez-Fernandez, J. C. (1992) Fourier transform infrared spectroscopy of the mixtures of palmitic acid with dipamitoylphosphatidylcholine using isotopic substitution. *Chem. Phys. Lipids* 62: 19-29.
- Virgin, I.; Ghanotakis, D. F. & Andersson, B. (1990) Light-induced D1-protein degradation in isolated photosystem II core complexes. *FEBS Lett.* 269: 45-48.
- Waggoner, C. M.; Pecoraro, V. & Yocum, C. F. (1989) Monovalent cations (Na^+ , K^+ , Cs^+) inhibit calcium activation of the photosynthetic oxygen evolution. *FEBS Lett.* 244: 237-240.
- Wasielewski, M. R.; Johnson, D. G.; Seibert, M. & Govindjee (1989) Determination of the primary charge separation rate in isolated photosystem II reaction centers with time 500-fs resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 524-528.
- Werst, M.; Jia, Y.; Mets, L. & Fleming, G. R. (1992) Energy transfer trapping in the photosystem I core antenna: a temperature study. *Biophys. J.* 61: 868-878.
- Wolfe, L. S. (1993) *Molecular & cell biology*. Wadsworth publishing company, California.
- Worrest, R. C. & Caldwell, M. M. (1986) *Stratospheric ozone reduction, solar ultraviolet radiation and plant life*, Springer, Berlin.
- Xu, Q.; Nelson, J. & Bricker, T. M. (1994) Secondary structure of the 33 kDa, extrinsic protein of the photosystem II: a far-UV circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta* 1188: 427-431.
- Yachandra, K. V.; DeRose, J. V.; Latimer, J. M.; Mukerji, I.; Sauer, K. and Klein, P. M. (1993) Where plants make oxygen: a structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster. *Science* 260: 675-676.

Zucchelli, G.; Garlaschi, F. M. & Jennings, R. C. (1988) Spectroscopy analysis of chlorophyll photobleaching in spinach thylakoids, grana and light harvesting chlorophyll a/b protein complex. J. Photochem Photobiol. B. Biol. 2: 483-490.